



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/57, 9/64, C12P 21/08, C07K 16/40</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/50611</p> <p>(43) 国際公開日 2000年8月31日(31.08.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04634</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月27日(27.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/47035 1999年2月24日(24.02.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 阪口 薫雄(SAKAGUCHI, Nobuo)(JP/JP) 桑原一彦(KUWAHARA, Kazuhiko)(JP/JP) 〒860-0811 熊本県熊本市本荘2-2-1 熊本大学医学部免疫学講座内 Kumamoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, JP, US</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: GANP PROTEINS</p> <p>(54)発明の名称 GANP蛋白質</p> <p>(57) Abstract Novel proteins having a kinase activity and genes encoding these proteins. Namely, GANP proteins specified by the amino acid sequences of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3 in Sequence Listing each participating in signal conversion of abnormal B cell differentiation in the autoimmune state and having a kinase activity; and polynucleotides encoding the same.</p>		

(57)要約

本発明の目的は、キナーゼ活性を有する新規な蛋白質及び該蛋白質をコードする遺伝子を提供することである。本発明によれば、配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に記載のアミノ酸配列により特定され、自己免疫状態において異常 B 細胞分化のシグナル変換に関与し、キナーゼ活性を有する GANP 蛋白質、及び該蛋白質をコードするポリヌクレオチドが提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

G A N P 蛋白質

技術分野

本発明は、キナーゼ活性を有する新規な蛋白質及び該蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。

背景技術

末梢リンパ系組織(peripheral lymphoid organs)の抗原特異性 B 細胞の活性化及び成熟は膜 IgR に結合する抗原により開始される(Rajewsky, Nature (Lond.), 381:751-758, 1996; Sakaguchi et al., Adv. Immunol. 54:337-392, 1993)。B 細胞は免疫後 48 時間以内に動脈周囲リンパ鞘 (PALS) (Rajewsky, Nature (Lond.), 381:751-758, 1996) の外側に入り、特異的 Th 細胞との共同刺激に依存性の相互作用及び樹状細胞の指状突起会合を開始する (MacLennan, Annu. Rev. Immunol., 12:117-139, 1994; Liu et al., Immunol. Rev., 156:111-126, 1997)。抗原に誘導された B 細胞は PALS の外側で増殖し、次にリンパ濾胞でさらに活性化され、胚中心(以下、本明細書において「GC」と略す場合がある。)が確立される (Han et al., J. Immunol., 155:556-567, 1995; Jacob et al., J. Exp. Med., 176:679-687, 1992; Kelsoe, Immunity, 4:107-111, 1996)。この B 細胞は成熟して、細胞周期の間に迅速に動き回って暗領域を形成する大型の slg⁺ セントロブラスト (中心芽細胞) となり、さらに成熟して表面の独特な特徴である PNA⁺B220⁺slgM⁺slgD⁻CD38⁻を GC の明領域に発現するセントロサイト (中心細胞) となる (Kosco-Vilbois et al., Immunol. Today, 18:225-230, 1997; Kelsoe, Immunol. Today, 16:324-326, 1995; Oliver et al., J. Immunol., 158:1108-1115, 1997)。

セントロサイトはおそらくアポトーシス又は免疫グロブリン V 領域の親和性成熟のいずれかの過程と、IgG クラス抗原へのクラススイッチの変化過程とを受け

ているが、一部のセントロサイトは記憶 B 細胞としてリンパ様画分中に長期間生存するようになる。その他のセントロサイトはおそらく GC の周辺帯に遊走し、さらなる抗原刺激と、CD40 や CD38 などの B 細胞活性化分子及び種々の B 細胞刺激性サイトカインのレセプターを経る共同刺激シグナルとを受ける (Gray et al., J. Exp. Med., 180:141-155, 1994; Foy et al., J. Exp. Med., 180:157-163, 1994)。この領域でさらに刺激される抗原特異性 B 細胞は、おそらく、様々な他の免疫担当細胞が抗原誘導 B 細胞と相互作用する可能性がある脾臓の間質性領域 (赤脾髄と呼ばれる。) 内に遊走する。数種の自己免疫マウスの組織化学的分析によって、形質細胞として、又はモット細胞 (Mott cells) と呼ばれる異常型の形質細胞として現れるこの領域に独特の抗体産生細胞が同定された (Tarlinton et al., Eur. J. Immunol., 22:531-539, 1992; Jiang et al., J. Immunol., 158:992-997, 1997)。

自己免疫は、自己/非自己の識別障害が抗原特異性リンパ球において頻繁に起こる現象である (Theofilopoulos, Immunol. Today, 16:90-98, 1995)。種々の自己免疫疾患の免疫系において、T 細胞及び B 細胞に関係する複合的なメカニズムが認められる (Theofilopoulos et al., Adv. Immunol., 37:269-290, 1985; Okamoto et al., J. Exp. Med., 175:71-79, 1992; Reininger et al., J. Exp. Med., 184:853-861, 1996; Theofilopoulos et al., Immunol. Rev., 55:179-216, 1981; Watanabe-Fukunaga et al., Nature (Lond.), 356:314-317, 1992; Takahashi et al., Cell, 76:969-976, 1994; Shlomchik et al., Nature (Lond.), 328:805-811, 1987)。

NZB 系及び NZW 系は、(NZB x NZW)_{F1} 系マウスとして、重篤な自己免疫状態である SLE を引き起こす多数の遺伝的因子によって特徴づけられている (Theofilopoulos et al., Adv. Immunol., 37:269-290, 1985; Okamoto et al., J. Exp. Med., 175:71-79, 1992; Reininger et al., J. Exp. Med., 184:853-861, 1996; Theofilopoulos et al., Immunol. Rev., 55:179-216, 1981)。NZB 系マウスでは、自己免疫性溶血性貧血を引き起こす抗赤血球抗体によって、自己免疫状態が自然発生的に形成され (Okamoto et al., J. Exp. Med., 175:71-79, 1992)、

NZW 系マウスは潜行性の自己免疫現象を示す (Reininger et al., J. Exp. Med., 184:853-861, 1996)。(NZB x NZW) F_1 系マウスの SLE 状態は、明らかに T 細胞及び B 細胞に関連する多数の遺伝的因子によって引き起こされている (Theofilopoulos et al., Immunol. Rev., 55:179-216, 1981)。NZB 系マウスは B 細胞の明らかな異常を示すが、NZB 系マウスにおける異常 B 細胞活性化の分子メカニズムは解明されていない。

発明の開示

このような B 細胞の成熟に関連する分子の問題を検討するため、本発明者らはマウスの B 細胞系統である WEHI-231 系の細胞内成分に対するモノクローナル抗体を作製した。この細胞系は NZB 系の遺伝的背景を有しており、29-15 と命名したモノクローナル抗体は、末梢リンパ系組織の GC-B 細胞で発現が増強される分化抗原を認識するものである。この 29-15 モノクローナル抗体を用いて、本発明者らは末梢リンパ系組織における抗原の発現を検討したところ、この抗原は高免疫マウスの GC の明領域で増強される分化抗原として特徴づけられた。NZB 系マウスの脾臓では、GANP 抗原を高度に発現する IgM 産生形質細胞が自己免疫の開始以前に現れるが、この発現が末梢免疫応答及び自己抗体による自己免疫を理解するために重要な分子挙動であることが示唆された。

本発明者らは、胚中心のセントロサイトで選択的に発現が増強される上記抗原を確認すべく研究を行ない、単離した cDNA プローブ (ganp プローブ) を用いたイン・サイチュ (in situ) RNA ハイブリダイゼーションによって、29-15 モノクローナル抗体で染色される領域において ganp mRNA の発現が増加することを確認した。また、その遺伝子産物である GANP 蛋白質が細胞質及び核内に局在する 210kD の蛋白質であり、酵母の転写調節遺伝子 SAC3 と構造的に類似することを確認した。抗 IgM 抗体及び抗 CD40 抗体で B 細胞を活性化したところ、GANP 蛋白質に結合してくるキナーゼの量が増加した。これらの結果から、GANP 蛋白質は、ある自己免疫状態において異常 B 細胞分化のシグナル変換に関与する可能性があることが示

唆された。本発明はこれらの知見を基にして完成された。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に記載のアミノ酸配列により特定される GANP 蛋白質を提供するものである。本発明により、配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において、一又は複数のアミノ酸が欠失し、一又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸で置換され、及び／又は一又は複数の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GANP 蛋白質と同質のキナーゼ活性を有する GANP 変異蛋白質が提供される。本発明により、上記 GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質のアミノ酸配列の全長をその部分配列として含むポリペプチドが提供される。

別の観点からは、本発明により、前記の GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質をコードするポリヌクレオチドが提供される。代表的なポリヌクレオチドは哺乳類動物由来の GANP 蛋白質をコードする DNA であり、それらのうち、哺乳類動物が有する遺伝子 DNA が好ましい。最も好ましいポリヌクレオチドの例は、配列表の配列番号 2 (マウス由来の GANP 蛋白質をコードする DNA 配列) または配列番号 4 (ヒト由来の GANP 蛋白質をコードする DNA 配列) に記載された塩基配列により特定される。

また、本発明により、前記ポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチド又は該アンチセンスポリヌクレオチドの誘導体が提供される。さらに、本発明により、前記ポリヌクレオチド又は前記アンチセンスポリヌクレオチドのうちの一部であって、連続する 12 以上の塩基からなるポリヌクレオチド又はアンチセンスポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチド又は前記アンチセンスポリヌクレオチドを化学修飾したポリヌクレオチド又はアンチセンスポリヌクレオチドが提供される。

さらに別の観点から、本発明により、配列表の配列番号 2 または配列番号 4 に記載の塩基配列からなる DNA あるいは他の哺乳類動物由来のホモログである DNA を取得する方法であって、前記のポリヌクレオチド又はアンチセンスポリヌクレオチドをプローブとして、哺乳類動物の cDNA ライブラリーから該プローブとハイ

ブリダイズする cDNA を取得する方法が提供される。該 cDNA の長さは GANP 遺伝子とほぼ同じ長さであり、それがコードする蛋白質は約 210kDa 程度である。また、本発明により、前記の方法により得られた cDNA 及びそれがコードする GANP 蛋白質が提供される。

本発明の別の観点からは、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質を認識する抗体が提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、正常マウスの PP における 29-15⁺細胞の検出を示した写真である。29-15 mAb 及び ALP 抗ラット Ig 抗体を用いて、PP について免疫組織化学的分析を実施した。陽性細胞は、ベクターブルー-ALP 基質を有する中央領域に出現し、非特異的内在性 ALP 活性を含む小腸絨毛では、周辺領域に強いシグナルが認められた。二色染色を行うために、切片はビオチン抗 B220 mAb 又はビオチン抗 IgD mAb のいずれかでさらに染色し、DAB 及び HRP-ストレプトアビジンによって発色させた。

図 2 は、SRBC 免疫化マウスの GC 領域における 29-15⁺細胞の出現を示した写真である。正常 BALB/c 系マウスは、12 日間に 4 回 SRBC を注射し、脾臓切片をヘマトキシリンで染色するか、図 1 と同様な免疫組織化学染色で調べた。29-15 mAb で染色した後に比較すると、正常及び SRBC 免疫化 BALB/c 系マウスの切片は類似していた。

図 3 は、SRBC 免疫化マウスの GC 領域における 29-15⁺細胞の出現を示した写真である。GC 領域の切片を「材料と方法」に記載した個々の色と組み合わせて PNA、抗 BrdU 及び 29-15 mAb で染色した。上段の写真は GC 領域 (GC) 及び中心溝動脈 (CA) のヘマトキシリン染色を示し、中央の写真は 29-15⁺PNA⁺細胞を指す三色染色を示す。下段は 29-15⁺PNA⁺細胞を図解したものである。

図 4 は、自己免疫傾向マウスの赤脾髄領域における GANP^{dense+}細胞の発現を示した写真である。BALB/c 系、NOD 系、NZB 系、(NZB x NZW)_{F1} 系、BXSB 系及び MRL/lpr 系の非免疫マウスの脾臓から切片を作製した。全てのマウスは生後 6~8 週間で使

用した。29-15 mAb で染色した GANP^{dense+}細胞は、NZB 系、(NZB x NZW)_{F1} 系、MRL/lpr 系及び BXSB 系の赤脾髄に出現した。

図 5 は、自己免疫傾向マウスの赤脾髄領域における GANP^{dense+}細胞の発現を示した写真である。膝窩領域の LN 切片を 29-15 mAb で染色した。GANP^{dense+}細胞は、高齢の NZB 系マウス (10 月齢) 及び MRL/lpr 系マウス (8 週齢) の末梢 LN に出現した。

図 6 は、自己免疫傾向マウスにおける GANP^{dense+}細胞の特徴づけを示した写真である。非免疫 NZB 系マウス (8 週齢) の脾臓切片を作製した。下記の試薬の一種と組み合わせて 29-15 mAb を用いて免疫組織化学的分析を実施した: 抗 B220、PNA。

図 7 は、自己免疫傾向マウスにおける GANP^{dense+}細胞の特徴づけを示した写真である。非免疫 NZB 系マウス (8 週齢) の脾臓切片を作製した。下記の試薬の一種と組み合わせて 29-15 mAb を用いて免疫組織化学的分析を実施した: 抗 IgM、抗 Syndecan-1、抗 BrdU mAb。

図 8 は、PAS 染色によって NZB 系マウスに現れるモット細胞を示した写真である。

図 9 は、マウス GANP 蛋白質の推定アミノ酸配列を 1 文字標記で示した図である。

図 10 は、GANP 蛋白質の構造を示した図である。図中、S/T rich region: セリン/トレオニンが豊富な領域、SAC3 homology region: SAC3 相同領域、nuclear localization signal: 核局在化シグナルを示す。4 つの LXXLL モチーフが存在する。

図 11 は、ganp 遺伝子のイン・サイチュ RNA ハイブリダイゼーションの結果を示した写真である。SRBC 免疫、非免疫 BALB/c 系、及び NZB 系マウスの脾臓切片を ganp アンチセンスプローブを用いてハイブリッド形成させた。図中、白脾髄領域 (WP)、赤脾髄領域 (RP) 及び GC 領域 (GC) を示す。NZB 系マウスの赤脾髄領域に GANP^{dense+}細胞が認められた。

図 12 は、GANP 蛋白質を免疫沈降後のウェスタンブロットで分析した結果を示した図である。GANP 蛋白質は、WEHI-231 系細胞の細胞質分画及び核分画で発現す

る 210kD の蛋白質として検出された。

図 1 3 は、正常 BALB/c 系マウスの脾臓 B 細胞を、ヤギ抗 IgM 抗体 (10 μ g/ml) 及び抗 CD40mAb (10 μ g/ml) の F(ab')₂ で 48 時間刺激し、抗 GANP mAb で染色した結果を示した図である。

図 1 4 は、抗 GANP 免疫沈降物を用いて [γ -³²P]-ATP の存在下で 10 分間インビトロのキナーゼ反応を実施した結果を示した図である。蛋白質のリン酸化は、SDS-PAGE による分離の後、オートラジオグラフィーによって検出した。GANP のリン酸化を矢印で示し (図 A)、リン酸化 GANP 蛋白質のホスホアミノ酸分析も示した (図 B)。

図 1 5 は、マウス GANP 蛋白質の構造を示した図である。図中、SAC3 および Map80 と相同な領域、核局在化配列 (NLS)、およびコイルドコイル領域を示す。4 つの LXXLL モチーフを黒で示す。

図 1 6 は、RT-PCR 分析の結果を示す。インビトロでの抗- μ 及び抗-CD40-刺激 B 細胞における ganpmRNA の活性化が示されている。HPRT をコントロールとして使用し、各鋳型の量を確認した。

図 1 7 は、インビトロキナーゼ反応の結果を示す。細胞溶解物を未刺激 (左) または刺激 (右) した細胞から調製し、抗 GANP 免疫沈降に付した。インビトロキナーゼ反応は [γ -³²P] ATP の存在下において 10 分間抗 GANP(42-23)免疫沈降物を用いて行った。蛋白質のリン酸化は SDS-PAGE 分離後にオートラジオグラフィーによって検出した。矢印はリン酸化された GANP の位置を示す。

図 1 8 は、GANP と MCM3 の物理的会合を示す図である。WEHI-231 からの細胞溶解物を抗-GST、抗-GANP(42-23)、または抗-MCM3 Ab で免疫沈降した。SDS-PAGE で分離後、蛋白質を電気泳動により膜に移し、抗 MCM3 - Ab をブローブとして検出した。

図 1 9 は、GANP と MCM3 の物理的会合を示す図である。WEHI-231 細胞溶解物からの抗-GST、抗-GANP(42-23)および抗-MCM3 免疫沈降物をインビトロキナーゼアッセイに付した。正常ウサギ血清 (NRS) を抗-MCM3 Ab のた

めのコントロールとして用いた。試料を7%SDS-PAGEで分離した。GANPおよびMCM3に対応するバンドを左側のパネルにおいて矢印で示した。右側のパネルでは、210-kDaのバンドのV8切断マッピングが同一の切断パターンを示した。コントロールとして、無関係のV8消化蛋白質を平行して分離した。

図20は、抗-MCM3 Abと抗-CR1 mAbまたはPNAとの二重染色を行った結果を示す図である。MCM3の発現はGC領域で活性化された。

図21は、ヒトGANP蛋白質の推定アミノ酸配列を1文字標記で示した図である。

図22は、ヒト染色体を用いてFISH法によってヒトganpとMap80をマッピングした結果を示す写真である。

発明を実施するための好ましい形態

本発明のGANP蛋白質の代表例は、配列表の配列番号1または配列番号3に示すアミノ酸配列により特定される蛋白質であり、210kDaの分子量を有し、かつキナーゼ活性を有することにより特徴付けられる。本発明により提供されるGANP変異蛋白質は、配列番号1または配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1個ないし数個、好ましくは1~20個、さらに好ましくは1~10個、最も好ましくは1~5個程度のアミノ酸残基が、置換、挿入、及び／又は欠失したアミノ酸配列により特定され、かつ配列番号1または配列番号3に示すアミノ酸配列により特定されるGANP蛋白質と実質的に同様なキナーゼ活性を有する。これらのGANP変異蛋白質はいずれも本発明の範囲に包含される。配列表の配列番号1または配列番号3に示すアミノ酸配列により特定される蛋白質及びそのホモログは、当該蛋白質が由来する哺乳類動物の胚中心のセントロサイトで選択的に発現が増強される蛋白質である。

通常、GANP蛋白質又はGANP変異蛋白質の活性ドメインは、全長のアミノ酸配列のN-末端及び／又はC-末端からアミノ酸残基を欠失させたポリペプチドを製造し、そのポリペプチドのキナーゼ活性を測定することにより容易に確認することができる。本発明により提供されるポリペプチドは、GANP蛋白質及びGANP変

異蛋白質の活性ドメインからなるポリペプチド、及び該活性ドメインからなるポリペプチドを部分配列として含むポリペプチドであり、GANP 蛋白質と実質的に同様なキナーゼ活性を有する。また、本発明により提供される別のポリペプチドは、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質のアミノ酸配列の全長をその部分配列として含むポリペプチドであり、GANP 蛋白質と実質的に同様なキナーゼ活性を有する。

本発明により提供されるポリヌクレオチドは、DNA 及び RNA のほか、DNA 又は RNA に化学修飾を施したポリヌクレオチドをすべて包含している。本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」という語は、天然に存在しないものを含めて最も広義に解釈しなければならない。本発明により提供されるポリヌクレオチドの代表例は、上記の GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質をコードする DNA 又は RNA である。また、本発明のポリヌクレオチドの別の例は、アンチセンスポリヌクレオチドである。

遺伝暗号の縮重を利用して、ポリヌクレオチドから生産されたポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく、該ポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも一部の塩基を他の種類の塩基に置換することができることは当業者に周知である。したがって、本発明のポリヌクレオチドには、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質をコードする全てのポリヌクレオチドが包含される。本発明の好ましい遺伝子の例として、配列表の配列番号 2 にマウス由来の GANP 蛋白質をコードする遺伝子を示し、また配列番号 4 にヒト由来の GANP 蛋白質をコードする遺伝子を示した。なお、GANP 変異蛋白質のアミノ酸配列は、該変異体をコードする遺伝子の塩基配列から決定することが可能である。例えば、市販のプログラム（例えば、Mac Vector（登録商標、イーストマンケミカル社製）や Genetix（ソフトウェア開発社製））を用いて行うことができる。

本発明の範囲には、GANP 蛋白質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体が包含される。アンチセンスポリヌクレオチドは上記ポリヌクレオチドの一態様として提供されるが、本明細書において、特にアンチセンス鎖の塩基配列からなるポリヌク

レオチドであることを明示する場合に「アンチセンスポリヌクレオチド」という場合がある。該アンチセンスポリヌクレオチドは、GANP 蛋白質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能であり、それがハイブリダイズするポリヌクレオチドがコード領域のポリヌクレオチドであれば、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの生合成を阻害することが可能である。

ポリペプチドの生合成を阻害するためのアンチセンスポリヌクレオチドは、12塩基以上からなることが好ましい。一方、細胞内に全長のアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませるためには、必要以上に長い配列は好ましくない。細胞内にアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませ、GANP 蛋白質の生合成を阻害する場合には、12塩基以上 30塩基以下、好ましくは 15塩基以上 25塩基以下、より好ましくは 18塩基以上 22塩基以下の塩基からなるアンチセンスポリヌクレオチドを用いるのがよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド又はその誘導体には、天然に存在するか否かにかかわらず、塩基、リン酸、及び糖からなるヌクレオチドが複数結合したものが全て包含される。代表的なものは、天然型のアンチセンス DNA 及びアンチセンス RNA である。非天然型のポリヌクレオチドとしては、例えば、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型などのポリヌクレオチドを挙げることができる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドについて、当業者に利用可能なアンチセンス技術を用いて、目的の DNA や mRNA との結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性などに優れた様々なアンチセンスポリヌクレオチド誘導体が得られる。

一般的には、ハイブリダイズのし易さの点では、RNA のループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つアンチセンスポリヌクレオチド又はその誘導体を設計することが好ましい。従って、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体についても、RNA のループ領域にハイブリダイズするものは好ましい例である。また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、又はスプライス部位の配列に相補的な配列を有するようなアン

チセンスポリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる。したがって、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド又はその誘導体であって、GANP 蛋白質をコードする遺伝子の翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、及び／又はスプライス部位の相補的な配列を含むものは、発現抑制効果の観点から好ましい態様である。

現在、一般的に知られているポリヌクレオチド誘導体のうち、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも一が高められた誘導体として、好ましくはフォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体を挙げることができる。本発明のポリヌクレオチド及びその誘導体には、これらの機能又は構造を有する誘導体が含まれる。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドのうち、天然型のアンチセンスポリヌクレオチドについては、化学合成機を使用して合成するか、GANP 蛋白質をコードする DNA を鋳型とする PCR 法により製造することができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型などのポリヌクレオチド誘導体は、通常、化学合成により製造することができる。この場合には、化学合成機に添付されている説明書に従って操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いた HPLC 法により精製することが可能である。

本発明の GANP 蛋白質をコードするポリヌクレオチド、そのアンチセンスポリヌクレオチド又はそれらの一部（例えば、連続する 12 以上の塩基からなるポリヌクレオチド）であるポリヌクレオチドは、哺乳類動物の cDNA ライブラリーから GANP 蛋白質をコードする DNA をスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。このような目的には、連続する 15 塩基以上の塩基配列からなるポリヌクレオチドが特に好ましい。プローブとして用いる該ポリヌクレオチドは誘導体であってもよい。通常、前記の塩基数以上の配列は特異性のある配列であると認識されている。

配列表の配列番号 2 または配列番号 4 に記載の塩基配列のうちの連続する 12 以上の塩基からなる DNA 又は該 DNA にハイブリダイズするポリヌクレオチド（ア

ンチセンスポリヌクレオチド)は、GANP 蛋白質をコードする DNA を cDNA ライブラリー等からスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。

また、本発明の GANP 蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくはそのアンチセンスポリヌクレオチド、又はそれらの一部であるポリヌクレオチドをプローブとして、各組織由来の mRNA についてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うことにより、GANP 遺伝子由来の mRNA が発現している組織を見出すことが可能である。さらに 12 以上の塩基からなるポリヌクレオチドはポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) のプライマーとして用いることができ、PCR により GANP 蛋白質をコードするポリヌクレオチドが得られる。また、プライマーを適宜選択することで、GANP 蛋白質の任意の一部をクローニングすることができる。

該プローブを用いたスクリーニングにおいて使用する cDNA ライブラリーとしては、mRNA から作製されたものが好ましく使用できる。これらの cDNA ライブラリーからランダムサンプリングにより選択された一群の cDNA を検索の試料とすることができる。また、cDNA ライブラリーとしては市販のものも使用可能である。

前記で得た GANP 遺伝子とハイブリダイズする cDNA を適当なベクター(例えば、pGEX-4T-1 ベクター)に挿入した後、宿主(例えば、大腸菌)に導入することで形質転換体を作製することができる。ベクターの種類及び宿主の種類は特に限定されないが、宿主の種類に応じて適宜の発現用ベクターを選択して用いることが可能である。宿主としては、大腸菌等の細菌類、酵母、又は動物細胞のいずれも使用可能である。組換えベクターを大腸菌等の適当な宿主に導入して形質転換体を得る方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。

本発明の GANP 遺伝子を導入した形質転換体を培養して遺伝子 DNA の増幅又は蛋白質の発現を行わせ、GANP 蛋白質を製造することが可能である。形質転換体の製造及び培養については各種の成書及び報告があり、種々の手段が開発され、当業界で汎用されている。従って、当業者は本明細書に記載された塩基配列に基づい

て GANP 蛋白質を容易に製造することが可能である。細胞に遺伝子を導入する手法として、塩化カルシウム法、リポフェクション法、プロトプラスト法、エレクトロポーレーション法などを用いることができる。

培養物から目的蛋白質の分離及び精製は当業者に利用可能な手段を適宜組み合わせで行うことができる。例えば、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行うことにより、本発明の GANP 蛋白質を効率よく回収及び精製することが可能である。より具体的には、免疫沈降法、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法や抗体クロマトグラフィー法等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー法、及び逆相クロマトグラフィー法などを適宜選択して行えばよい。GANP 変異蛋白質をコードする遺伝子を用いることによって、GANP 変異蛋白質を同様に製造することができる。

また、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質は、他のポリペプチドとの融合ペプチドとして製造することも可能である。このような融合ペプチドも本発明の範囲に包含される。融合すべきポリペプチドの種類は特に限定されないが、例えば、細胞外分泌を促進するシグナルペプチドなどを挙げることができる。このような融合蛋白質の製造も形質転換体を用いて行うことができる。融合蛋白質を用いて GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質を製造する場合には、融合蛋白質をブロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理し、切り出された目的物を分離及び精製すればよい。

本発明の GANP 蛋白質若しくは GANP 変異蛋白質、又はそれらの部分ポリペプチドを用いて、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質を認識する抗体を製造することができる。本発明の抗体は、哺乳類動物を GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質で免疫感作することによって当業界で汎用の方法に従って製造できる。該抗体が本発明の GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質を認識することは、ウェスタンブロット法、ELISA 法、又は免疫染色法（例えば FACS での測定）等により確認することが可能

である。免疫原としては、GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質のほか、それらの一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いてもよい。GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質の一部は 8 アミノ酸残基以上であることが好ましく、このようなポリペプチドは、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。

また、免疫した動物のリンパ球を用いて製造したハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を本発明の抗体として用いてもよい。モノクローナル抗体の製造方法については当業界で周知されており、かつ汎用されている(『Antibodies, A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) 第 6 章)。また、本発明の抗体として、抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントやキメラ抗体を用いることも可能である。なお、本発明の GANP 蛋白質又は GANP 変異蛋白質は、抗体を用いる方法又は抗体と酵素を用いる方法などによって検出可能である。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

実施例

実施例 1 : マウス GANP 遺伝子のクローニングと発現の解析

<材料及び方法>

(1) 動物及び免疫化

BALB/c 系マウス及び Lewis 系ラットは、セアク・吉富 (Seac Yoshitomi Ltd.) (福岡) より購入した。NZB 系、NZW 系、(NZB x NZW) F_1 系マウス (7 週齢、メス)、MRL/lpr 系マウス (8 週齢、メス) 及び BXSb 系マウス (7 週齢、オス) は、日本 SLC (静岡) より入手した。高齢の NZB 系マウス (10 月齢、メス) は、広瀬幸子博士 (順天堂大学医学部、病理学教室) より寄贈頂いた。NOD 系マウス (7 週齢、オス) は、宮崎純一博士 (大阪大学医学部、栄養生理化学教室) より提供頂いた。動物は全て熊本大学の動物研究開発センターで飼育した。BALB/c 系マウスはヒツ

ジ赤血球（日本バイオテスト研究所、東京）で複数回免疫した。免疫は 5 日間隔で静注により実施し、免疫組織化学的分析を行うために胸腺、脾臓、リンパ節（LN）及びバイエル板（PP）の切片標本を作製した。

（2）細胞及び細胞培養

BALB/c 系マウスの脾臓 B 細胞を既報の通り（Nomura et al., Immunol. Lett., 45:195-203, 1995）増殖させた。この細胞を二酸化炭素を 5% 含むインキュベーター中 37°C で、熱不活化 FCS（大日本製薬株式会社、大阪）10%、L-グルタミン（Biowhitteker、アメリカ・メリーランド州 Walkersville）5mM、ペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml、及び 2-ME 50 μ M を含む RPMI-1640 培地（Gibco-BRL、ドイツ・Gaithersburg）で培養した。

（3）29-15 モノクローナル抗体（以下、「29-15mAb」と略す。）の確立

（BALB/c x NZB）F₁ 系マウスより鉋物油を用いて確立したマウスの B 細胞系統である WEHI-231 系に対する mAb を、既報（Kuwahara et al., J. Immunol., 152:2742-2752, 1994）の方法によって作製した。簡潔に説明すると、阪口らの方法（Sakaguchi et al., EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J., 5:2139-2147, 1986）により、表面表現型 slgM⁺slgD⁺B220⁺を有する WEHI-231 系の細胞溶解液を、界面活性剤の非存在下、低張緩衝液中で調製し、リン酸緩衝液（PBS）に対して透析した。この細胞溶解液を完全フロイントアジュバント（CFA）（Difco Laboratories、アメリカ・ミシガン州デトロイト）に懸濁して Lewis 系ラットの足の肉趾中に投与してマウスを免疫にし、不完全フロイントアジュバント（IFA）（Difco Laboratories）に懸濁して 4 日目と 8 日目に追加免疫を 2 回行った。9 日後、膝窩及び鼠径領域のリンパ節を切除し、リンパ様細胞懸濁液を調製した。ハイブリドーマの確立、HAT 培地（Gibco-BRL）の選択、及びハイブリドーマクローンのリクローニングは、既述の通り行った（Kuwahara et al., J. Immunol., 152:2742-2752, 1994）。免疫組織化学的分析においてリンパ様細胞を染色する 29-15 mAb を選択した。

（4）抗体及び試薬

親和精製したヤギの抗マウス μ 抗体のF(ab')₂断片(ICN Pharmaceutical, Inc., アメリカ・カリフォルニア州コストメーサ)、ビオチン結合ビーナツ凝集素(PNA)(Vector Laboratories, Inc., アメリカ・カリフォルニア州バーリンゲーム)、ビオチン結合抗CD35mAb(PharMingen, San Diego, CA)、アルカリホスファターゼ(ALP)結合ヤギ抗ラットIgAb(#59301, ICN)、H R P結合ヤギ抗ラットIgAb(ICN)、H R P結合ストレプトアビジン(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)、ALP結合ヤギ抗マウスIgAb(Sigma Chemicals Co., St. Louis, MI)、FITC結合マウス抗ラット κ mAb(ICN)、PE結合抗-B220mAb(PharMingen)、およびALP結合ヤギ抗ウサギIgAb(Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA)は購入したものを用いた。抗B220(RA3-6B2)、抗 μ (AM/3)及び抗 δ (CS/15)などのビオチン結合mAbは、当研究室で作製した。抗CD40 mAb(LB429)は当研究室で確立した(Nomura et al., Immunol. Lett., 45:195-203, 1995)。AM/3及びCS/15のハイブリドーマは、三宅健介博士(佐賀医科大学、免疫学教室)より提供頂いた。ビオチン結合抗Syndecan-1は、ファーマーミンゲン(PharMingen)(アメリカ・カリフォルニア州サンディエゴ)より購入した。抗BrdU mAbは、ノボカストラ・ラボラトリーズ・リミテッド(Novocastra Laboratories, Ltd.)(イギリス・ニューカッスル)より入手した。ウサギ抗マウスMCM3/P1 Abは文献に記載されている(Kimura, H 他, 1994, EMBO J. 13, 4311-4320)。

(5) 免疫組織化学

免疫組織化学的染色は、既報の通り実施した(Ezaki et al., Arch. Histol. Cytol., 58:104-115, 1995; Yamanouchi et al., Eur. J. Immunol., 28:696-707, 1998)。簡潔に説明すると、BALB/c系、NZB系、(NZB x NZW)F₁系、NOD系、BXSB系及びMRL/lpr系マウスより切除した標的器官を、OCT化合物(マイルス・インコーポレーティッド(Miles Inc.))、アメリカ・インディアナ州エルクハート)中に置いた。ゼラチンコートしたスライドグラス上に置いた6 μ mの凍結切片を完全に空気乾燥した。次にスライドグラスをアセトンで10分間固定し、続いてPBSで15分間再水和した。スライドグラスを29-15 mAbと共に60分間インキュベ-

トし、PBS で数回洗浄した。アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ラット Ig 抗体 (ALP-抗ラット Ig、カタログ番号 59301、ICN Pharmaceutical, Inc.) と共にインキュベートした後、スライドガラスを PBS で 4 回洗浄した。スライドガラスはベクター・ブルー (Vector Laboratories) を使用して現像した。

二次染色のため、スライドガラスをビオチン標識 mAb 及びホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合ストレプトアビジン (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., アメリカ・メリーランド州、ガイサースバーグ) と共にインキュベートした。p-ジメチルアミノアゾベンゼン (DAB、同仁化学研究所、熊本) で現像した後、切片を 1% グルタルアルデヒド・PBS 溶液で軽く固定した。生体内 (in vivo) で活発な増殖をしている細胞を検出するために、器官を採取する 1 時間前に BrdU (Sigma Chemicals Co., アメリカ・ミズーリ州、セントルイス) を静脈内注射した。DNA 合成を行っている細胞は、抗 BrdU mAb 及び ALP 結合ヤギ抗マウス Ig 抗体 (Sigma Chemicals Co.) で染色することによって検出し、ベクター・レッドで現像した (Matsuno et al., Cell Tissue Res., 257:459-470, 1989)。過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色を既報 (Jiang et al, J. Immunol., 158:992-997, 1997) の通り実施した。切片は全てアクアテックス (Aquatex) (E. Merck、ドイツ・ダルムシュタット) でマウントした。

(6) λ gt11 ベクターを使用した cDNA の分子クローニング

20mM IPTG に予め浸したニトロセルロースフィルター (Schleicher and Schuell、ドイツ・ダルムシュタット) 上に融合タンパクを移した後、29-15 mAb の上澄を使用して、マウス脾臓、マウス骨髄、WEHI-231 細胞及び A20 細胞からの mRNA で構築された cDNA ライブラリーをスクリーニングした (Inui et al., J. Immunol., 154:2714-2723, 1995)。ファージプレートを 42°C で 4 時間インキュベーションし、次にプレートをフィルターで覆い、さらに 37°C で 4 時間インキュベーションした。フィルターを洗浄緩衝液 (Tween 20 0.1% 含有 PBS) で 3 回洗浄し、ブロック緩衝液 (0.1% Tween 20 含有 PBS、5% 脱脂乾燥乳) 中で 1 時間ブロックし、次に 29-15 mAb と共にインキュベートした。¹²⁵I で標識したヒツジ抗ラット Ig 抗体 (Amersham、

イギリス・バッキンガムシャー)を使用したオートラジオグラフィーによって陽性のシグナルを検出した。最初の cDNA クローンは、融合タンパクとしてポリペプチドをコードすることができる 280bp の断片を含有していた。この最初の 280bp の断片を使用して、より長い cDNA クローンを別の WEHI-231 cDNA ライブラリーから単離した。二次 cDNA クローンの 4.9kb の断片は、最長の 4.5kb のオープンリーディングフレームをコードした。さらに 5'配列を決定するために、5'-RACE 法を利用した Gibco-BRL 社の race キットを使用した。

(7) 組織切片上のイン・サイチュ・RNA ハイブリダイゼーション

イン・サイチュ・RNA ハイブリダイゼーションを既報 (Kondo et al., Blood, 80:2044-2051, 1992) の通り実施した。パラフィン包埋切片をシラン化したスライドグラス上にマウントした。スライドグラスを脱パラフィン処理した後、ジゴキシゲニンで標識した ganp 280bp リボプローブを使用してハイブリダイゼーションを 50°C で 16 時間実施した。スライドグラスを TNE 緩衝液 (10mM トリス塩酸 [pH7.6]、500mM 塩化ナトリウム、1mM EDTA) で数回、37°C で洗浄した後、2×及び/又は 0.2×SSC 溶液で 50°C で洗浄した。抗ジゴキシゲニン抗体を使用しつつ、ALP 基質の存在下で発色させた。

(8) GST-cDNA 融合タンパク及び別の抗 GANP mAb の作製

GANP の一部 (配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 679~1028 番のアミノ酸) をコードする ganp cDNA 断片を pGEX-4T-1 ベクター (Pharmacia Biotech, アメリカ・ニュージャージー州 Piscataway) に導入した。組換えプラスミドは全ての挿入及び結合についての DNA 塩基配列決定で確認した。GST-GANP 融合タンパクは、グルタチオン-セファロース (Pharmacia) カラムクロマトグラフィーによって、既報 (Inui et al., J. Immunol., 154:2714-2723, 1995) の通り作製した。42-43 と命名した抗 GANP mAb は、上述のようにラットにおける融合タンパクの免疫によって確立した。

(9) ウェスタンブロット分析

蛋白質ゲル電気泳動、ウェスタンブロット転移及び蛋白質の免疫検出を既報

(Kuwahara et al., *Int. Immunol.*, 8:1273-1285, 1996) の通り実施した。5,000 万個の細胞を 1ml の TNE 溶解緩衝液 (10mM トリス塩酸[pH7.8]、150mM 塩化ナトリウム、1mM EDTA、1%NP-40、0.02%NaN₃) で溶解し、免疫複合体を SDS-PAGE (7%) で分析した。蛋白質をニトロセルロースフィルター上に移した後、脱脂乾燥乳を 5%含有する PBS-Tween 20 でフィルターをブロックし、抗 GANP mAb と共に 60 分間インキュベートした。PBS-Tween 20 で数回洗浄した後、フィルターを HRP 結合ヤギ抗ラット Ig (ICN Pharmaceutical, Inc.) と共に 30 分間インキュベートした。ECL 検出キット (Amersham) を使用して発色させた。

(10) 亜細胞分画化

完全な核を既報 (Schriber et al., *Nucleic Acids Res.*, 17:6419, 1989) の通り分離した。WEHI-231 系細胞を TBS で洗浄し、ペレットを緩衝液 A (10mM HEPES[pH 7.9]、10mM 塩化カリウム、0.1mM EDTA、0.1mM EGTA、1mM DTT、0.5mM PMSF) 中に再懸濁し、氷上で 15 分間インキュベートし、NP-40 を最終的に 1%になるように加えた。遠心分離の後、上澄を細胞質分画として回収した。ペレットを同一の緩衝液で再懸濁及び均質化し、染色によって完全な核を得た。試料を遠心分離し、ペレットを冷緩衝液 C (20mM HEPES[pH 7.9]、0.4M 塩化ナトリウム、1mM EDTA、1mM EGTA、1mM DTT、1mM PMSF) に再懸濁し、遠心分離した。上澄を核分画として -80°C で凍結した。

(11) イン・ビトロのキナーゼ反応及びホスホアミノ酸分析

イン・ビトロでのキナーゼ反応を免疫沈降物を用いて既報 (Kuwahara et al., *J. Immunol.*, 152:2742-2752, 1994) の通り実施した。脾臓 B 細胞を既報 (Nomura et al., *Immunol. Lett.*, 45:195-203, 1995) の方法によって精製した。B 細胞は既報 (Nomura et al., *Immunol. Lett.*, 45:195-203, 1995) の通り、イン・ビトロでヤギ抗 IgM 抗体及び抗 CD40mAb (LB429) の F(ab')₂ 分画で 48 時間刺激した。細胞を集めて洗浄した後、TNE 溶解緩衝液で溶解し、抗 GANP mAb (42-23) で免疫沈降させた。免疫沈降物は[γ-³²P]-ATP (Amersham) と共にインキュベートし、放射性標識した蛋白質を SDS-PAGE (7%) を用いてオートラジオグラフィーで分析

した。GANP に対応するバンドを乾燥ゲルより除いた。SDS をゲルから除去した後、均質化したゲルを TPCK-トリプシン (Sigma Chemicals Co.) によって 37°C で一晩消化した。試料は 6N 塩酸で加水分解し、TLC (E. Merck) 上で電気泳動した。

示された蛋白質の V 8 切断マッピングは既報の通りに行った (Kawahara, K., 他, 1994, J. Immunol. 152:2742-2752)。

(12) 細胞質染色

細胞を 2.5% パラホルムアルデヒド・PBS 溶液で固定し、氷上 70% エタノールに 1 時間浸透化した。細胞を 29-15 mAb 及び FITC 結合マウス抗ラット κ mAb と共にインキュベートした。抗体結合は、FACScan フローサイトメトリー (Becton-Dickinson、アメリカ・カリフォルニア州マウンテンビュー) で分析した。

(13) 免疫沈降-ウエスタンブロット分析

上記 (10) 亜細胞分画化で得た蛋白質を、プロテイン G-セファロースと組み合わせて抗 GANP mAb と一緒に免疫沈降し、SDS-PAGE で分析した。ウエスタンブロットフィルターを抗 GANP mAb とインキュベートし、次いで HRP-抗ラット Ig とインキュベートした。現像は ECL 検出キット (Amersham) を用いて行った。

(14) 逆転写酵素 PCR (RT-PCR)

TRISOL (Gibco BRL, Rockville, MD) を用いて培養 B 細胞から精製した全 RNA (各々 1 μ g) を Superscript (Gibco BRL) を用いる cDNA 合成 (100 μ l 容量) のための鋳型として用いた。PCR 増幅は、Taq-Gold (Perkin-Elmer, Foster, CA) および ganp または HPRT (対照) のためのプライマー (Han, S., 他, 1996. Science. 274:2094-2097) とを用いて、各 cDNA 溶液 2 μ l を用いて行った。ganp 転写物は 5'-CCGTGGGATGACATCATCAC-3' (フォワードプライマー) (配列表の配列番号 5) および 5'-CATGTCCACCATCTCCAGCA-3' (リバープライマー) (配列表の配列番号 6) により増幅された。

<結果>

(1) リンパ様器官における GANP 抗原の発現

WEHI-231 系細胞の溶解液でラットを免疫することによって末梢 B 細胞中に発現する分化抗原を認識する mAb を作製した。BALB/c 系マウスの正常リンパ様器官について、29-15 mAb を使用した免疫組織化学的分析では、骨髓中の発現は検出されなかったが、胸腺、脾臓及びリンパ節などのリンパ様器官ではわずかな発現が認められた。脾臓の赤脾髄及びリンパ節の副皮質では少数の細胞が 29-15 抗原を強く発現していた。発現が PP の濾胞の中心領域において非常に強かったことは興味深い (図 1)。細胞は抗 B220 mAb で陽性であり、一方、抗 IgD mAb では陽性ではない。正常マウスは、小腸管腔を通じて導入された種々の抗原物質の継続的刺激のために、PP 中の明瞭な GC と共に二次リンパ様濾胞を与えた。

ヒツジ赤血球 (SRBC) による免疫を繰り返すことで、12 日以内に脾臓中にリンパ様濾胞が形成された。抗原免疫化によって、PP の GC に加えて、脾臓及びリンパ節の GC 領域においても 29-15⁺細胞が出現した (図 2)。29-15 抗原は GC の細胞中で増強していた。二次リンパ様濾胞の構造において 29-15⁺細胞の表現型をさらに分析したところ、ほぼ半数の PNA⁺ GC-B 細胞が 29-15 mAb に陽性であり、一方、抗 BrdU mAb には陰性であった (図 3)。興味深いことに、29-15 抗原の発現は、中心溝動脈からの入口の遠位領域でセントロサイトにおいて増強されていた。この表現型は GC-B 細胞の判定基準と一致しており、すでに述べたように 29-15 抗原の「GANP」という名の裏付けとなっている。

(2) 自己免疫傾向 NZB 系マウスの赤脾髄領域における GANP^{dense+}B 細胞の出現

イン・ビボの刺激がない場合、正常マウスは脾臓の濾胞領域でほとんど GANP⁺B 細胞を発現しないが、BALB/c 系 (図 2) 及び C57BL/6 系の赤脾髄領域では GANP 蛋白質が著しく発現している GANP^{dense+}細胞が少々認められた。この細胞は大型であり、普通の B 細胞とは明らかに異なる。しかし、若齢の NZB 系マウス (8 週齢) では、この GANP^{dense+}細胞は、免疫のない脾臓の赤脾髄領域で自然に増加した (図 4)。別の自己免疫傾向マウスである NZW 系では、5~12 週齢において赤脾髄では

GANP^{dense+}細胞を発現していなかったが、重篤な疾患の組合せである(NZB x NZW)F₁系では、赤脾髄において GANP^{dense+}細胞が中程度発現していた。

他の自己免疫傾向マウスの脾臓において GANP^{dense+}細胞も自然に現れるか否かを検討した。GANP^{dense+}細胞は、BXS^B系及び MRL/lpr 系の脾臓に出現するが、特定の病原がない状態 (SPF) の同様の週齢の NZW 系及び NOD 系マウスでは顕著な出現は認められなかった。GANP^{dense+}細胞は加齢の間に識別できるようになり、発病した老齢の NZB 系マウス (10 月齢) の末梢リンパ節に出現した。GANP^{dense+}細胞はリンパ節では大部分が後期の段階に出現するようであり、MRL/lpr 系では若齢の段階 (8 週齢) でリンパ節に GANP^{dense+}細胞が出現することは特に興味深い (図 5)。これらの結果から、自己免疫傾向の NZB 系、BXS^B系及び MRL/lpr 系マウスの遺伝的因子は、赤脾髄領域における GANP^{dense+}細胞の出現及びリンパ節内への漸増を制御する可能性があることが示唆される。

二色分析によって、赤脾髄における GANP^{dense+}細胞の表現型が PNA⁻B220⁻細胞 (図 6) 及び IgD⁻CD38⁻細胞として示された。これらの細胞は、形質細胞を選択的に染色する抗 Syndecan-1 mAb で染色した場合に陽性となる。GANP^{dense+}細胞は細胞質で IgM を発現するが (図 7)、この細胞がモット細胞である可能性があることから (Jiang, Y., S. Hirose, Y. Hamano, S. Koderu, H. Tsurui, M. Abe, K. Terashima, S. Ishikawa 及び T. Shirai. 1997. J. Immunol. 158:992-997)、PAS 染色で切片を染色したところ、GANP^{dense+}細胞は、B220⁻Syndecan-1⁺PNA⁻BrdU⁻ GANP^{dense+} (図 8) 及び CD40⁻CD38⁻とともに PAS⁻であった。この形質様細胞は NZB 系マウスの脾臓において優先的に現れるが、現在報告されているモット細胞とは異なる。

(3) GANP 抗原をコードする cDNA クローンの同定

我々は、29-15 mAb を使用して、WEHI-231 系 cDNA ライブラリーより候補の cDNA クローン (280bp の挿入 DNA を有する) を単離し、さらに ganp と命名したより長い cDNA を単離した。ヌクレオチド配列の全長 (6429bp) をオーバーラップクローンで決定することによって、分子の大きさが 210kD と予測される 1971 個のアミノ酸からなるポリペプチドが推定された (図 9)。GANP 蛋白質のアミノ酸配列を配

列表の配列番号 1 に、*ganp* cDNA の塩基配列を配列表の配列番号 2 に示す。

GANP アミノ酸配列は、温度突然変異体であるサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に特徴的な核転写調節因子であると考えられる SAC3 およびヒト Map 80 蛋白質 (Takei, Y 他, 1998, J. Biol. Chem. 273:22177-22180) と部分的に相同性を示す (図 10 および図 15; Bauer, A. 及び R. Koelling. 1996. Yeast 12:965-975)。また、GANP 蛋白質は、インスリン促進因子 (アミノ酸 996 ~1063)、及び NF-IL-6 (アミノ酸 388~450) を含む種々の転写因子の短い領域内に低い相同性を示す。

GANP 遺伝子は超らせんモチーフのコンセンサス塩基配列を有するが、ジンクフィンガー、ロイシンジッパー及びホメオドメインのモチーフは認められない。セリン/トレオニンの豊富な領域が N-末端の 100 個のアミノ酸中に認められたが、この領域は核膜孔複合体として知られるヌクレオポリンとわずかに相同性を有していた。GANP は二つの核局在配列 (⁴⁹⁷HKKK 及び ¹³⁴⁴PMKQKRR) を有するが、これらは PSORT プログラムで示唆されるように、核における GANP の発現に関与している可能性がある。GANP はまた 2 つのコイルド-コイルモチーフを有するが、ジンクフィンガー、ロイシンジッパーあるいはホメオドメインモチーフは有していない。さらには、CBP/p300 および p/CIP を含む核転写コ・アクティベータ分子中に認められる 4 つの LXXLL モチーフが存在していたが (Torchia J. et al., 1997, Nature (Lond.), 387:677-684; Heery et al., 1997, Nature (Lond.), 387:733-736)、これらのモチーフを通じた会合分子は同定されていない。

(5) *ganp* 転写の発現

ノーザンブロット分析によって 7kb の mRNA が検出されたが、対照の β -アクチンのシグナルに比較して非常に弱いシグナルであり、その発現は試験を行った全ての細胞系、器官及び組織においてかなり偏在していた。29-15 mAb により切片上に検出された領域と同一の領域で *ganp* mRNA が増強されるか否かを検討するために、イン・サイチュ・RNA ハイブリダイゼーション分析を行なったところ、*ganp* mRNA が SRBC で免疫した脾臓の GC の中央領域において大量に発現されおり、一方、

免疫されていない脾臓 (図 11)、胸腺、及びリンパ節では発現されていなかった。ganp mRNA は免疫したマウスの GC-B 細胞において増強されたが、この発現パターンは、同一の切片上のヘマトキシリン染色に基づく 29-15 mAb による結果と非常に類似していた。非免疫 BALB/c 系マウスにおいては、PP の GC 領域でも ganp mRNA が増強されており、ganp mRNA の発現は、非免疫 NZB 系マウスの脾臓の赤脾髄領域の形質様細胞で盛んであった (図 11)。これらの結果から、ganp 遺伝子が 29-15 mAb によって認識される分子をコードすることが示唆される。

(6) B 細胞における GANP の発現

抗 GANP mAb (42-23) によって、WEHI-231 系細胞の核及び細胞質の両区画から、210kD の一本の蛋白質バンドが検出された (図 12)。つぎに、B 系細胞の活性化及び分化に GANP が機能的に関係する証拠を見出す目的で、非免疫 BALB/c 系マウスの B 細胞を抗 IgM 及び抗 CD40 を併用してイン・ビトロで刺激したところ、抗 GANP mAb で検出される GANP 蛋白質の発現が増加した (図 13)。イン・ビトロの GANP 免疫沈降物とのキナーゼ反応では、イン・ビトロで刺激された脾臓 B 細胞において GANP 蛋白質に結合しているキナーゼ活性が上昇した。従って、GANP 蛋白質では、セリン／トレオニン残基にリン酸化が誘発される (図 14)。これらの結果から、末梢免疫応答において、GANP が B 細胞を活性化している可能性が示唆された。

また、抗 μ Ab および抗 CD 40 mAb による刺激は最大応答を示したが、これらの何れか片方では、僅かの応答のみを示した (データは示さず)。この活性化はまた、インビトロでの抗 μ および抗 CD 40 コ・ライゲーションによって刺激された B 細胞における ganp mRNA の増加によっても検出された (図 16)。コントロール HPRT mRNA と比較して刺激後 24 時間および 48 時間において ganp mRNA の量が増大することが RT-PCR により明確に実証された。

210kDa の GANP 蛋白質は多数の潜在的リン酸化部位を有しているので、我々は抗 GANP 免疫沈降物とのインビトロキナーゼ反応によるリン酸化の誘導を試験した。図 17 に示される通り、210kDa の蛋白質のリン酸化が、抗 μ および抗 C

D 4 0 コ・ライゲーションによって刺激された脾臓B細胞からの抗-GANP 免疫沈降物中に見られた。この結果は、GANP が沈降してもキナーゼ活性が維持されることを示している。

(7) GANP とMCM3 蛋白質との会合

我々は、GANP のカルボキシル末端にMap 80 相同領域(アミノ酸レベルで76.3%の同一性)を見つけた。Map 80 は、MCM3 (DNA複製に必須の蛋白質)の細胞質と核の間の転移に関与する80kDaの核蛋白質である(Takei, Y. 他, 1998, J.Biol.Chem. 273:22177-22180; Kimura, H. 他, 1994, EMBO J. 13:4311-4320; Chong, J.P. 他, 1996, Trends Biochem.Sci. 21:102-106; 及び Romanowski, P. 他, 1996, Curr.Biol. 6:1416-1425)。そこで、我々は WEHI-231 における GANP とMCM3 との相互作用について試験した。我々は、抗 GANP 免疫沈降物にMCM3 が含まれていることを検出した。MCM蛋白質のリン酸化状態は細胞周期の進行の調節において決定的であるようなので(Kimura, H. 他, 1994, EMBO J. 13:4311-4320; Chong, J.P. 他, 1996, Trends Biochem.Sci. 21:102-106; 及び Romanowski, P. 他, 1996, Curr.Biol. 6:1416-1425)、抗MCM3 免疫沈降物を用いてインビトロキナーゼアッセイを行った。MCM3 の免疫沈降により210kDaの位置にリン酸化蛋白質が同時に沈降し、これは GANP と同じサイズである(図19の左のパネル)。抗 GANP と抗MCM3 免疫沈降物由来のこれらの210kDaのバンドはV8切断マッピングにおいて同一のパターンを示し(図19の右のパネル)、GANP とMCM3 とがB細胞株中で会合していることが示唆される。

次に、我々は、MCM3 がインビボでマウスの抗原免疫化によってGC-B細胞において活性化されるかどうかを試験した。上記で使用したものに隣接する切片を抗MCM3 Abで染色した(図20)。MCM3 はGCsにおいても活性化されている。二重染色によりMCM3 とPNAの両方の同時局在が明白に実証された。GC領域の一部はFDCs(リンパ濾胞細胞)によって強く囲まれている。これらの結果により、MCM3 は、FDCsによって大部分が囲まれているセン

トロブラストおよび GANP⁺ セントロサイトを含む GC-B 細胞で活性化されていることが実証された (図 20)。

(8) 考察

以上のように、本発明者らは、脾臓の二次濾胞の明領域に局在する GC-B 細胞で発現される新規な蛋白質である GANP を見出した。正常の条件下では多種類の細胞で痕跡量の ganp mRNA が検出可能であるが、GANP 蛋白質は免疫されたマウスの特定の GC 領域で増強される。多数の研究によって、mAb を用いて又は特異的な cDNA クローニングによって認識される分子として、GC 中の種々の分化抗原が示されている (Christoph et al., *Int. Immunol.*, 6:1203-1211, 1994; Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:10222-10227, 1996; Kuo et al., *J. Exp. Med.*, 186:1547-1556, 1997)。ほとんどの分子は GC-B 細胞の全領域に出現するが、8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼは暗領域において発現する (Kuo et al., *J. Exp. Med.*, 186:1547-1556, 1997)。

GANP 抗原が明領域であるセントロサイトにおいて選択的であることは興味深い。最近の研究では、免疫グロブリン遺伝子の再構成に必要な RAG 蛋白質は明領域のセントロサイトにおいて選択的に発現していることが示されている (Hikida et al., *Science (Wash. DC)*, 274:2092-2094, 1996; Han et al., *Science (Wash. DC)*, 274:2094-2097, 1996)。パパバシリオウら及びハンらによって示されているように (Papavasiliou et al., *Science (Wash. DC)*, 278:298-301, 1997; Han et al., *Science (Wash. DC)*, 278:301-305, 1997)、GC 領域は T 細胞依存性の抗体応答の間に起こる二次 Ig 遺伝子再構成の部位を提供しているので、GANP 蛋白質は、セントロサイト段階での抗原特異的 B 細胞の成熟に関係する成分であるのかもしれない。

我々は、GANP のカルボキシル末端部分が MCM3 の核転移を容易にするヒト Map80 (Takei, Y 他, 1998, *J. Biol. Chem.* 273:22177-22180) と有意な類似性を有することを見出した。免疫沈降実験により GANP が WEHI-231 における MCM3 にも結合することが実証された。MCM3 は、DNA 複製の開始に必須である M

CM蛋白質ファミリー(Kimura,H.他, 1994, EMBO J. 13:4311-4320;Blow,J.J.1993. J.Cell Biol.122.993-1002;Tye,B.K. 1994. Trends Cell Biol.4:160-166;Chong, J.P: 他, 1996, Trends Biochem.Sci.21:102-106; Romanowski,P. 他, 1996, Curr.Biol. 6:1416-1425 及び Thommes,P. 他, 1992, Nucl.Acids Res. 20:1069-1074) の一員である。核MCM蛋白質の主要画分はS期の開始時にクロマチンに結合するが、複製中に解離し、核質に遊離蛋白質として蓄積する。クロマチンからのMCMsの放出は複数のMCM蛋白質のリン酸化によって達成され、有糸分裂後のそれらの再会合はそれらの脱リン酸化を付随する。MCM蛋白質は、増殖が抑制された分化中の細胞では合成されず、半減期に関連した速度で消滅するようである(Musahl,C.,他, 1998, Exp.Cell.Res.241, 260-264)。MCM3蛋白質は最近、アポトーシス性蛋白質分解の初期の標的であることが示された(Schwab,B.L.他, 1998, Exp.Cell Res. 238:415-421)。Schwab,B.L.他は、MCM3の活発な破壊がMCM複合体を不活性化し、細胞死プログラムの実行中の時期外れのDNA複製現象を防止する役割を担っていることを提唱している。我々の結果は、GC-B細胞が高レベルのMCM3を発現し、そのうちのあるものはGANPと会合することを示している。しかし、細胞周期を停止した分化した細胞で活性化された蛋白質が、S期の進行に必須な別の蛋白質に結合することは奇妙である。GANPの機能は、結合を通じてのMCM3蛋白質の不活性化であることが推測される。免疫組織化学データは次の考えと一致する。GANPは、増殖を停止したセントロサイトで活性化される一方、MCM3は急速に周期しているセントロプラストそしてGCsのセントロサイトでも発現している。MCM3の量は遺伝子発現と活発な破壊を停止することによって減少するであろうが(Musahl,C.,他, 1998, Exp.Cell.Res.241, 260-264; 及び Schwab, B.L.他, 1998, Exp.Cell Res. 238:415-421)、GANPとの相互作用を通じてのセントロサイトで依然発現するMCM3の不活性化は、DNA複製を防止する別の機構であるかもしれない。さらに、GANPおよびMCM3は共に同時沈降するキナーゼによってリン酸化されるようになる(図19)。高度にリン酸化されたMCM3は不活性化形態であると考えら

れるため (Kimura, H. 他, 1994, EMBO J. 13:4311-4320)、GANP との会合は M C M 3 のリン酸化を刺激するかもしれない。

さらに、GANP 蛋白質は酵母のサッカロミセス・セレビシエの SAC3 分子 (SAC、アクチンのサプレッサー) と密接な相同性を有しているが、この菌はアクチン遺伝子において温度感受性突然変異 (act1-1) のサプレッサーの遺伝的スクリーニングで単離されたものである (図 10; Novick et al., Genetics, 121:659-674, 1989)。SAC3 蛋白質は核で発現しており、有糸分裂の正常な進行及び染色体の損失に対する保護のために必要である (Bauer et al., J. Cell Sci., 109:1575-1583, 1996)。また、SAC3 の欠失 (null) 変異体は非常にゆっくりと成長し、野生型の細胞よりも大型である。SAC3 はアクチン細胞骨格及び有糸分裂の両方に影響する過程に関与しているが、これは SAC3 がアクチン又はアクチン結合蛋白質の遺伝子発現を調節することを示している。

サッカロミセスにおいてロイシン透過酵素活性の転写を増加させる遺伝子 (LEP-1 と呼ばれる) は、SAC3 と同一である (Stella et al., Yeast, 11:460-460, 1995)。LEP-1 遺伝子は、選択的アミノ酸輸送に関係する酵母菌ロイシン透過酵素の増強を引き起こすが、真核細胞におけるアミノ酸輸送、特にアミノ酸透過に関与する分子に関してはよく判っていない (Mastroberardino et al., Nature (Lond.), 395:288-291, 1998)。SAC3/LEP-1 配列は多数の転写因子と相同のモチーフを示さないが、すでに決定された生物学的機能 (Bauer et al., J. Cell Sci., 109:1575-1583, 1996) からは、この配列が核において種々の標的遺伝子の調節活性を有することが示唆されている。マウスの GANP は、核転写因子に対する典型的なコンセンサスモチーフを示さないものの、酵母の SAC3 遺伝子と共通の先祖をもち、可能なリン酸化部位、2 つの核の局在化配列、及び他の転写分子と相互作用する可能性がある 2 つの超らせん構造と構造的に類似している。

GANP は、A g 免疫化した脾臓のセントロサイトにおいて選択的に活性化されている。それは、G C 領域中の F D C s と密接に相互作用するセントロサイトサブセットを特定するための分化マーカーとしても有用である。我々の研究は、B C

R シグナルと CD 4 0 同時刺激が一緒になって GANP の活性化を引き起こし、GANP /MCM 3 複合体を介したシグナル伝達を誘導することを示した。

常染色体の劣性遺伝子疾患の自己免疫多腺性内分泌障害 (APECED) における欠損遺伝子は、ヒト第 21 染色体 (21q22.3) の連鎖分析によって場所が特定されるが、この遺伝子は可能な転写レギュレーターで AIRE 遺伝子産物をコードしており (Nagamine et al., *Nature Genet.*, 17:393-398, 1997)、この自己抗体は副腎及び他の生殖腺産生組織で発現される AIRE 蛋白質を認識している。APECED の研究から、核コ・アクティベータ活性を有する分子の関与が自己免疫と関係する可能性が考えられる。AIRE 及び GANP の両蛋白質は、転写レギュレーターの典型的なドメインを有していないが、核転写コ・アクティベータにおいて同様に観察されるような LXXLL モチーフを有している。

B 細胞特異性核コ・アクティベータ (Bob1/OCA-B/OBF1) は、最近、細胞型特異性レギュレーターである Oct1 及び Oct2 として特徴付けられた (Luo et al., *Mol. Cell. Biol.*, 15:4115-4124, 1995)。OCA-B 標的マウスでは、T-依存性抗原を用いた免疫の後、脾臓において GC 形成の障害が認められるが、これは GC 領域において B 細胞成熟が機能的に関与することを示唆している (Kim et al., *Nature (Lond.)*, 383:542-547, 1996; Qin et al., *EMBO J.*, 17:5066-5075, 1998)。GANP 蛋白質はセントロサイトにおける OCA-B 細胞の制御下に発現される可能性があり、核コ・アクティベータ分子の分子的相互作用の問題は、GC における B 細胞成熟を理解するために重要であると思われる。

SLE のニュージーランドモデルは、疾病感受性遺伝子の染色体位置をマッピングするためのゲノム連鎖研究の実験材料である。腎炎、及び第 4 染色体上 (Nba1 と称する)、第 7 染色体上及び第 1 染色体上 (Nba2 と称する; Vyse et al., *J. Immunol.*, 158:5566-5574, 1997) などの自己抗体産生に連鎖する少なくとも 12 の非 MHC 遺伝子座がそれぞれ独立にマッピングされた。大型細胞上の GANP 抗原は、非免疫 NZB 系マウスの赤脾髄領域で高度に増強されるが (図 4 ~ 8)、NZB 系マウスは、赤脾髄領域にモット細胞と呼ばれる類似の大型 IgM 産生細胞を有していた。

モット細胞は、NZB 系及び(NZB x NZW)F1 系マウスにおいて選択的に現れるが、正常 BALB/c 系又は C57BL/6 系マウスには出現しない。

モット細胞の前駆細胞はおそらく B-1 B 細胞であり (Tarlinton et al., Eur. J. Immunol., 22:531-539, 1992; Jiang et al., J. Immunol., 158:992-997, 1997)、このことは B 細胞が自己免疫と密接に関係することを示唆している。モット細胞は、細胞質において IgM の封入体によって識別され、PAS で陽性に染色される (Tarlinton et al., Eur. J. Immunol., 22:531-539, 1992; Jiang et al., J. Immunol., 158:992-997, 1997)。GANP^{dense+}細胞はモット細胞であると思われるので PAS 染色を行ったところ、NZB 系マウスの赤脾髄領域の GANP^{dense+}細胞は PAS⁻であった。GANP^{dense+}IgM 産生細胞はモット細胞と同様に NZB 系マウスの脾臓中に現れるが、これらの細胞は異なるものであった。疾病感受性にリンクする染色体の遺伝子座の一つに関係する異常 B 細胞集団の活性化が起こり得るが、この活性化によって IgM 産生細胞の新しい型が生じるのかもしれない。

いくつかの研究グループから報告された Lyn^{-/-}マウス及び CD40L^{-/-}マウスは、類似した自己免疫及び高 IgM 症候群を示すが、これらの状態では封入体を有する免疫芽細胞が脾臓において多く認められる (Hibbs et al., Cell, 83:301-311, 1995; Nishizumi et al., Immunity, 3:549-560, 1995; Xu et al., Immunity, 1:423-431, 1994)。これらの観察から、BCR 及び CD40 によるシグナルの形質導入によって、異常抗体産生形質細胞の産生が調節されていることが示唆される。また、抗 IgM 及び抗 CD40 抗体で脾臓 B 細胞を刺激することによって GANP 蛋白質のリン酸化活性が誘発されるが、この観察から、GANP 蛋白質が GC 領域における B 細胞活性化部位の下流と関係し得ること、及び NZB 系マウスにおける異常 B 細胞活性化が、GANP 蛋白質の発現の増加に関係し得ることが示唆された。

実施例 2 : ヒト GANP 遺伝子のクローニング

ラットの GANP 遺伝子の配列の情報に基づいてヒトの GANP 遺伝子のクローニングおよび配列決定を行った。具体的には、λgt11-ヒト heart cDNA ライブラリー

(Clontech) を使用し、プライマーとして gspl-1 : TTTGTCTGGAGGATGATCGC (配列表の配列番号 7)、gspl-2 : AAAGAGAAAGGGGCCAGGCC (配列表の配列番号 8)、および gspl-3 : CCAGCTTCTTGTCCTCCAAAAGC (配列表の配列番号 9) を使用し、さらに 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Gibco BRL) を用い、常法によりクローニングと塩基配列の決定を行った。

得られたクローンの塩基配列を決定した。得られたヒト GANP 遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号 4 に示す。また、この塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を配列番号 3 および図 2 1 に示す。ヒト GANP 遺伝子はマウス GANP 遺伝子と高い相同性を示し、またヒト GANP はカルボキシル末端側に 80-kDa の Map80 ドメインを含んでいた。

In situ RNA ハイブリダイゼーションにより、ganp 転写物は、扁桃腺の GC 領域で活性化されているようであった。GANP⁺細胞は、メモリー B 細胞の CD 38⁺ Ig D⁻ 表現型を発現している。これらの結果は、ヒト GANP が二次リンパ組織における GC-B 細胞でも発現していることを示した。また、1980 アミノ酸から成るヒト GANP は、B 細胞中の MCM 3 蛋白質に結合する Map 80 相同領域のストレッチを有することから、GC-B 細胞における細胞周期調節に GANP が関与していることが示唆される。

さらに、得られたヒト GANP 遺伝子とヒト染色体標本を用いて FISH 法により In situ ハイブリダイゼーションを行った。結果を図 2 2 に示す。図 2 2 から分かるように、ヒト GANP 遺伝子と Map 80 を有するゲノム断片は染色体 2 1 番長腕 2 2. 3 にマッピングされた。

産業上の利用可能性

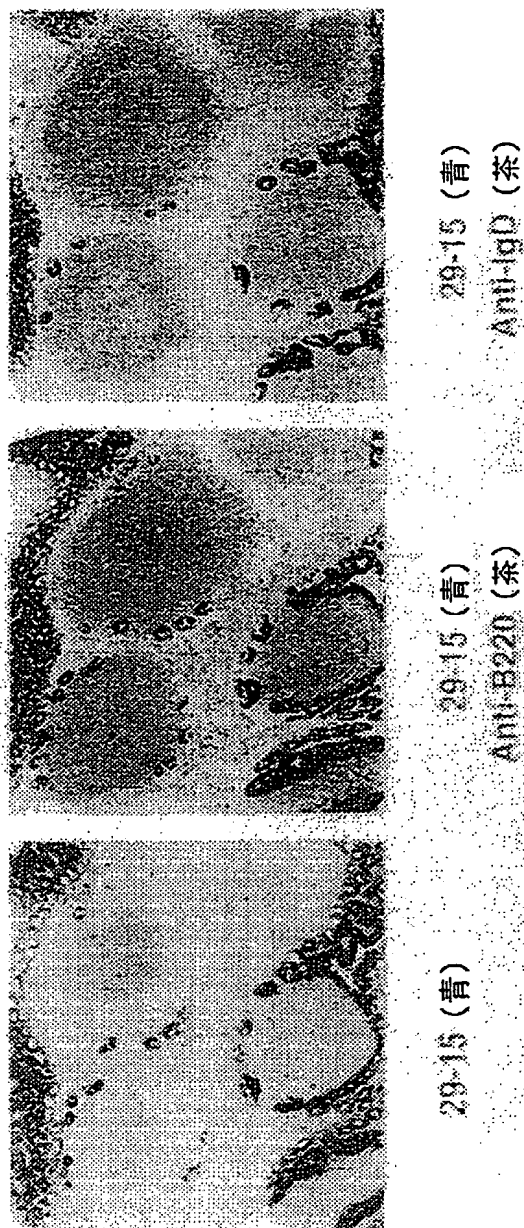
本発明の蛋白質はキナーゼ活性を有する新規な蛋白質であり、自己免疫状態において異常 B 細胞分化のシグナル変換に関与する可能性がある。従って、本発明の蛋白質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド及び抗体は、自己免疫の機構を解明するのに有用である。

請 求 の 範 囲

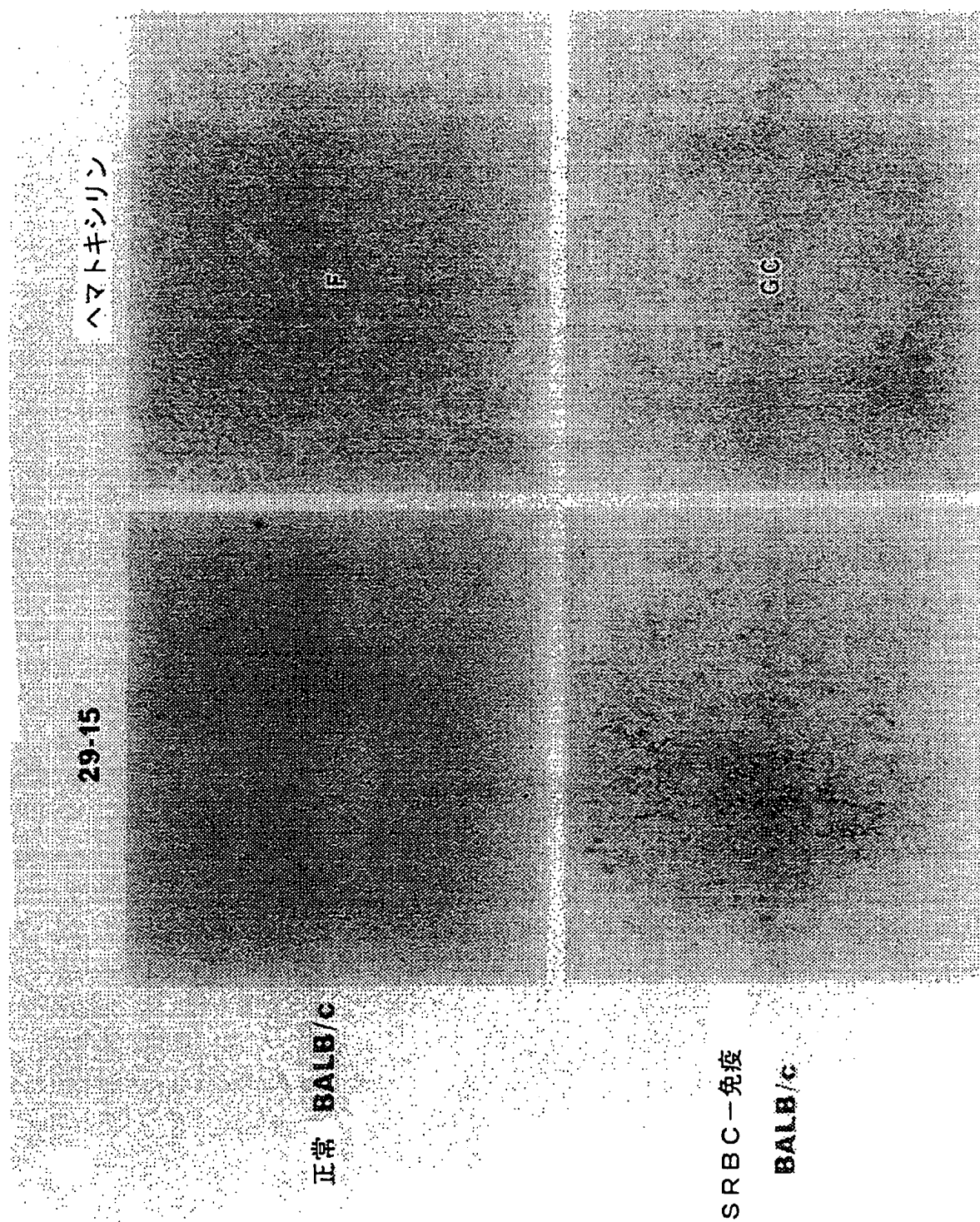
1. 配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に記載のアミノ酸配列により特定される GANP 蛋白質。
2. 配列表の配列番号 1 または 3 に記載のアミノ酸配列において、一若しくは複数のアミノ酸が欠失しており、一若しくは複数のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されており、及び／又は一若しくは複数の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ請求の範囲第 1 項に記載の GANP 蛋白質と同様のキナーゼ活性を有する GANP 変異蛋白質。
3. 請求の範囲第 1 項に記載の GANP 蛋白質又は請求の範囲第 2 項に記載の GANP 変異蛋白質のアミノ酸配列の全長をその部分配列として含むポリペプチド。
4. 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
5. 請求の範囲第 3 項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
6. 請求の範囲第 4 項又は第 5 項に記載のポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチド。
7. 請求の範囲第 4 項ないし第 6 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの部分配列であって、連続する 12 塩基以上からなるポリヌクレオチド。
8. 化学修飾された請求の範囲第 4 項ないし第 7 項に記載のポリヌクレオチド。
9. 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の蛋白質を認識する抗体。

第 1 図

Expression of GANP antigen in B cells of Peyer's patches



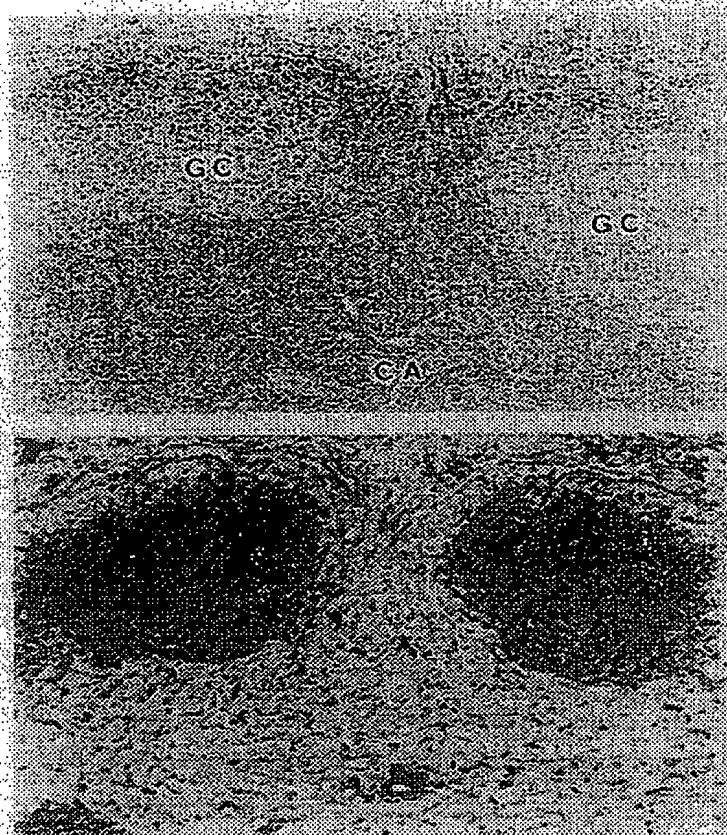
第 2 図



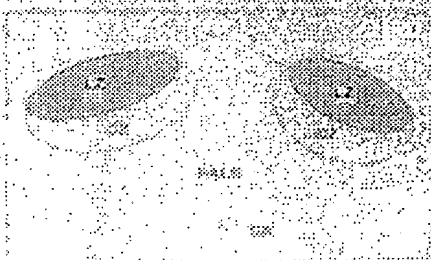
第3図

GANP antigen expressed in PNA⁺ cells
at the distal part of GCs

B

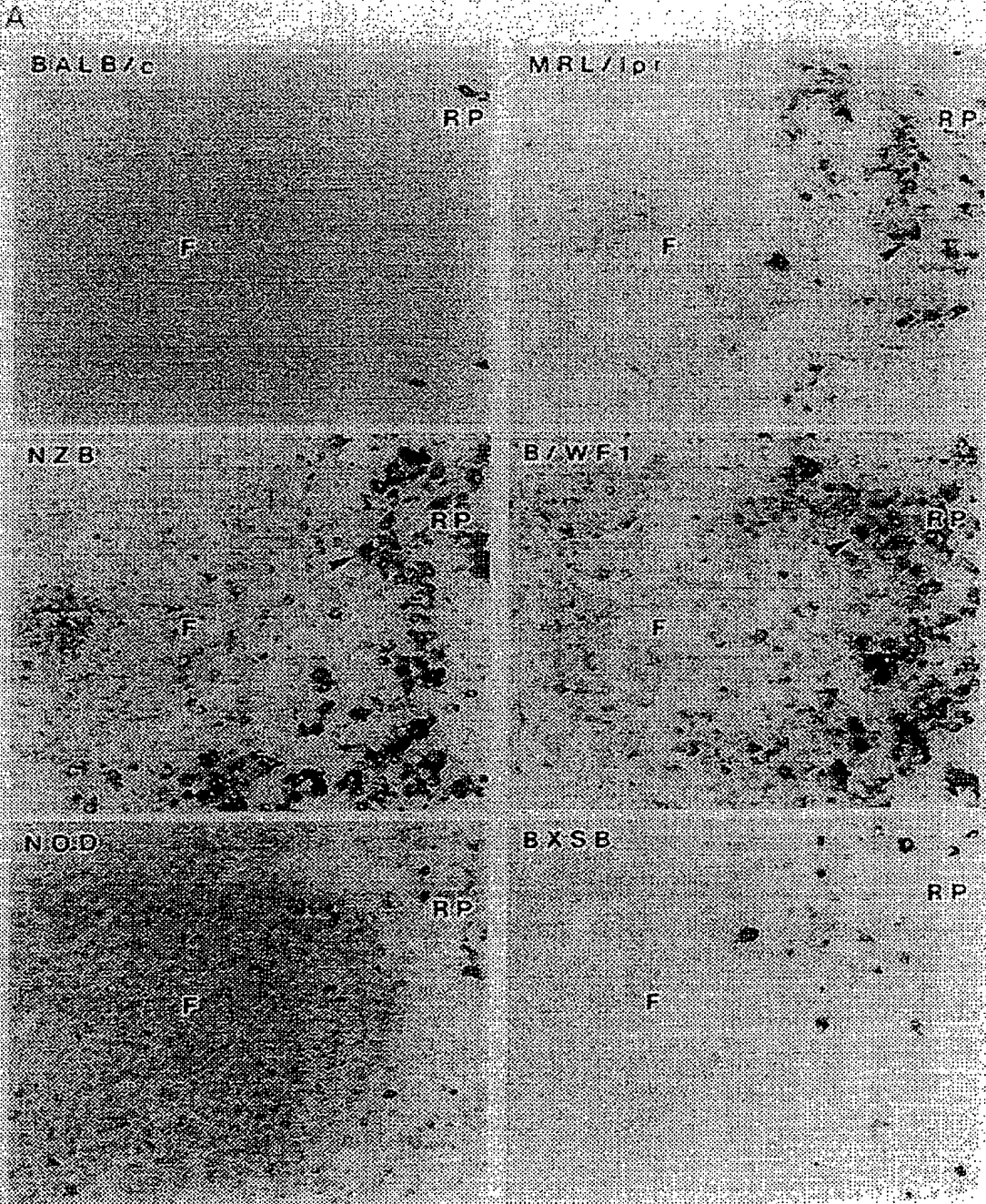


29-15 (青), PNA (茶), Anti-BrdU (赤).

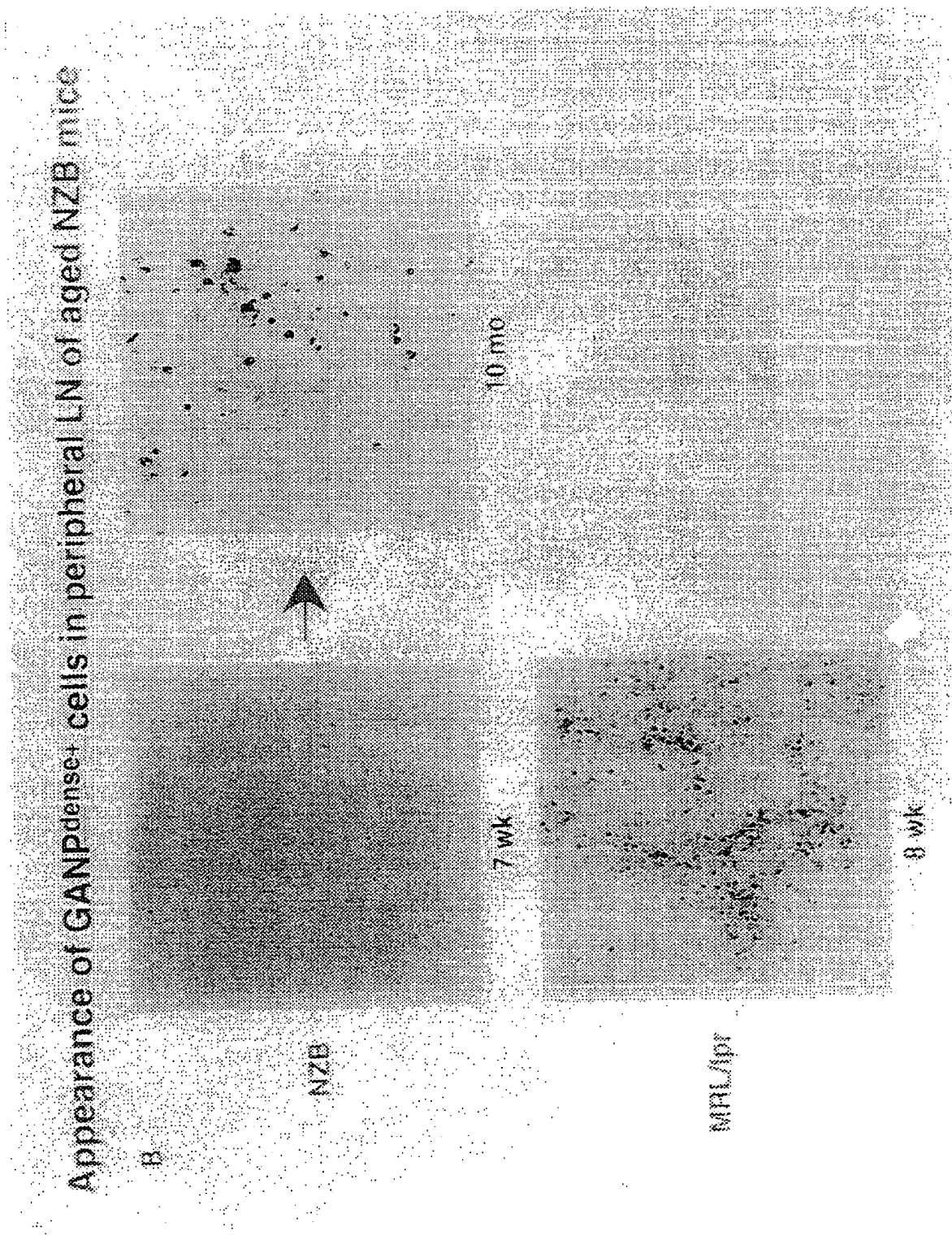


第4図

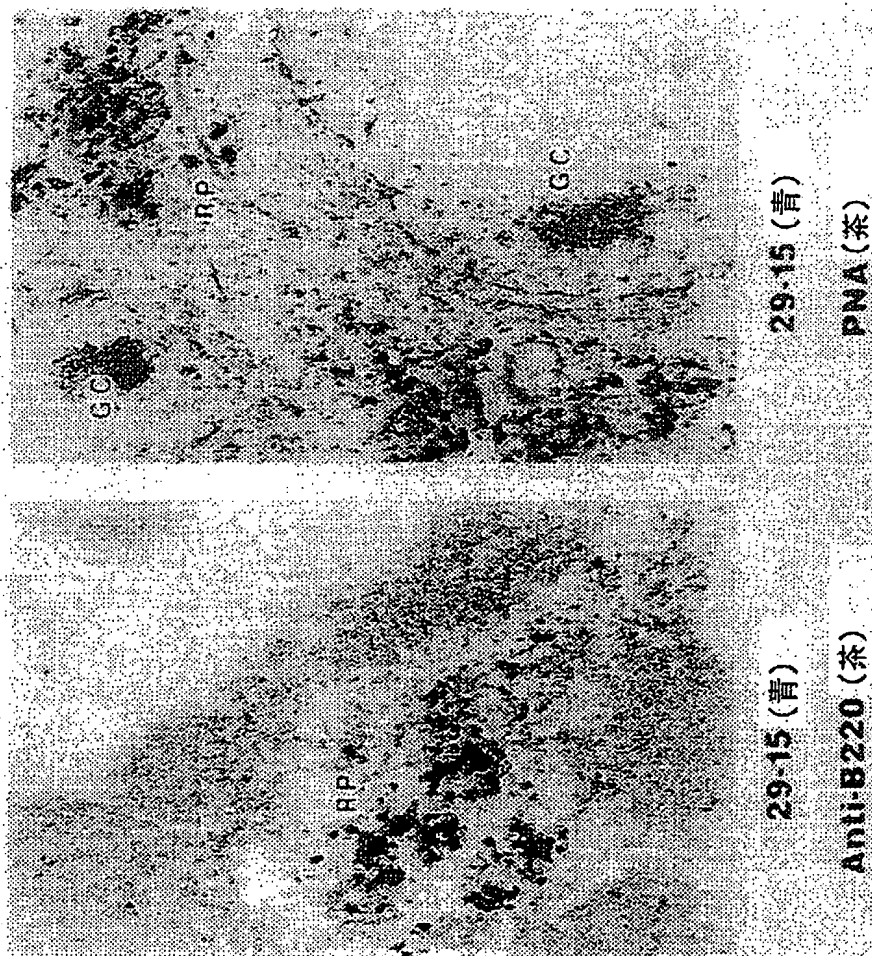
Appearance of GANP^{dense+} cells in the red pulp of autoimmune-prone mice



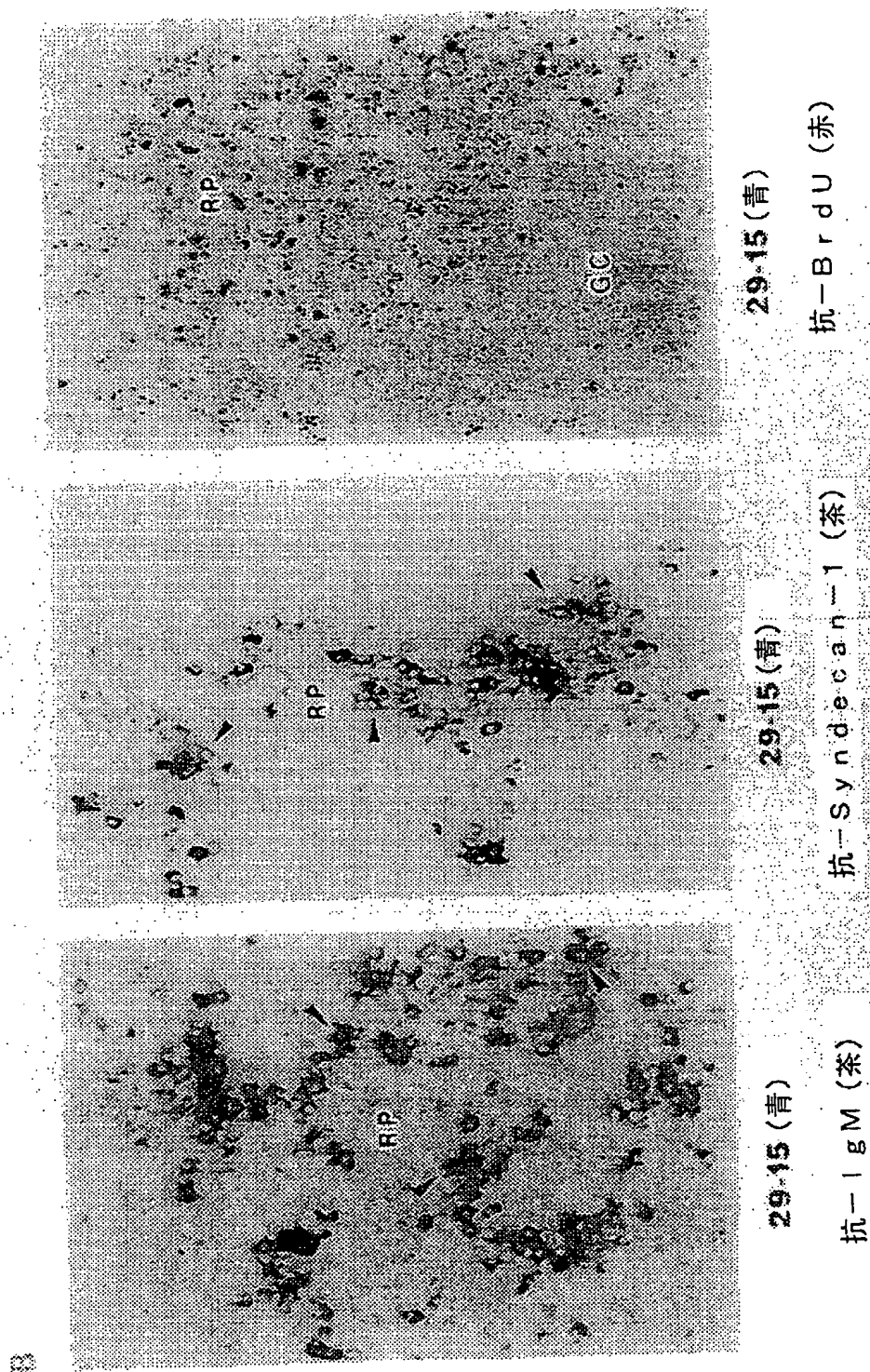
第5図



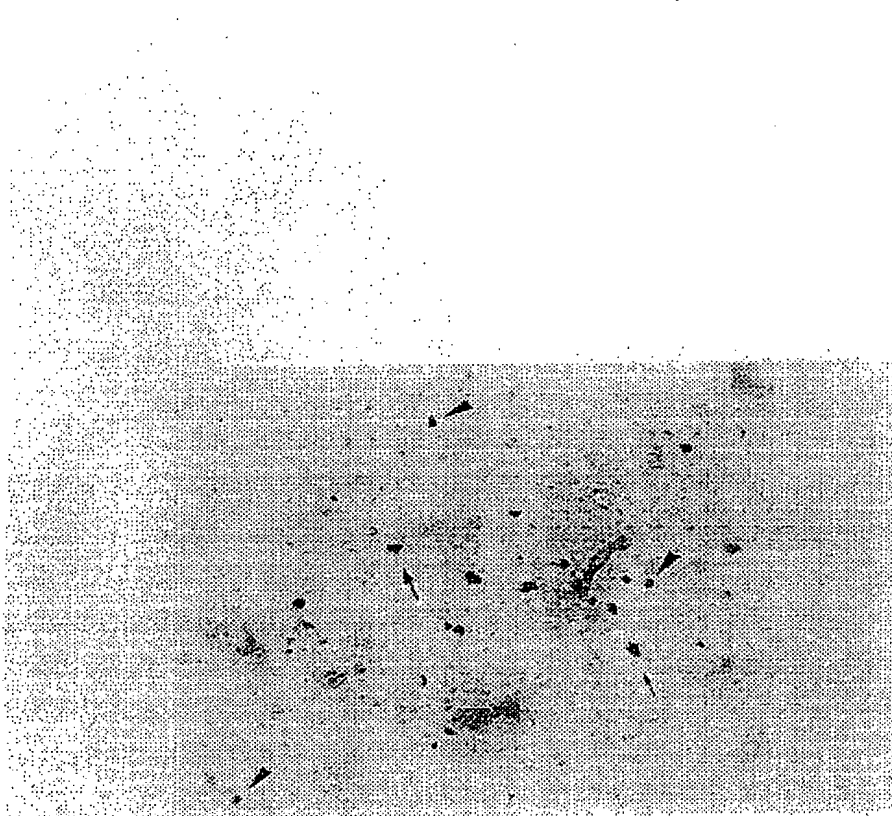
第6図



第7図



第8図



29-15 (青)

PAS staining

第9図

MHPVNPFGGS SPSAFVSSS TTGTQTKSP FRFGQPSLFG QNSTPSKSLA⁵⁰
FSQVPSFATP SGGSHSSSLP AFGLTQTSSV GLFSSLESTP SFAATSSSSV¹⁰⁰
PGNTAFSFKS TSSVGVFPGS ATFGPETGEV AGSGFRKTEF KFKPLENAVF¹⁵⁰
KPIPGPESEP EKTQSQISSG FFTFSHPVGS GSGGLTPFSF PQVTNSSVTS²⁰⁰
SSFIFSKPVT SNTPAFASPL SNQNVEEEKR VSTSAFGSSN SSFSTFPTAS²⁵⁰
PGSLGEPFPA NKPSLRQGCE EAISQVEPLP TLMKGLKRKE DQDRSPRRHC³⁰⁰
HEAAEDPDPL SRGDHPPDKR PVRLNRPRGG TLFGRTIQEV FKSNEAGRL³⁵⁰
GSKESKESGF AEPGESDHAA VPGGSQSTMV PSRLPAVTKE EEESRDEKED⁴⁰⁰
SLRGKSVRQS KRREWIYSL GGVSSLELTA IQCKNIPDYL NDRAILEKHF⁴⁵⁰
SKIAKVQRVF TRRSKKLAVI HFFDHASAA ARKKGKGLHK DVVIFWHKKK⁵⁰⁰
ISPSKKLFPL KEKLGESSEAS QGIEDSPFQH SPLSKPIVRP AAGSLLSKSS⁵⁵⁰
PVKKPSLLKM HQFEADPFDS GSEGSEGLGS CVSSLSTLIG TVADTSEEKY⁶⁰⁰
RLLDQRDRIM RQARVKRTDL DKARAFVGTG PDMCPEKERY LRETRSQLSV⁶⁵⁰
FEVVPGETDQV DHAAAVKEYS RSSADQEEPL PHELPSAVL SRTMDYLVTO⁷⁰⁰
IMDQKEGSLR DWYDFVWNRT RGIRKDITQQ HLCPLTVSL IEKCTRFH⁷⁵⁰
CAHFMCEPM SSFDAKINNE NMTKCLQSLK EMYQDLRNKG VFCASEAEFQ⁸⁰⁰
GYNVLLNLNK GDILREVQQF HPDVRNSPEV NFAVQAFAL NSNNFVRFFK⁸⁵⁰
LVQSASYLNA CLLHCYFNQI RKDALRALNV AYTSTQRTST VFPLDGVVRM⁹⁰⁰
LLFRDSEEAT NFLNYHGLTV ADGCVELNRS AFLEPEGLCK ARKSVFIGRK⁹⁵⁰
LTVSVGEVNV GGPLPPVPRH TPVCSFNSQN KYVGESLATE LPISTQRAGG¹⁰⁰⁰
DPAGGGRGED CEAEDLPTL AVLPQPPAS SATPALHVQP LAPAAAPSL¹⁰⁵⁰
QASTQPEVLL PKPAPVYSDS DLVQVDELI QEALQVDCEE VSSAGAAVYA¹¹⁰⁰
AALGVSNAAV EDLITAATTG ILRHVAAEEV SMERQRLEEE KQRAEEERLK¹¹⁵⁰
QERELMLTQL SEGGLAEELTE LTVTECVWET CSQELQSAVK IDQKVRVARC¹²⁰⁰
CEAVCAHLVD LFLAEEIFQT AKETLQELQC FCKYLQRWRE AVAARKKFR¹²⁵⁰
QMRAPPAAPC CVDVNDRLQA LVPSAECPIE EENLAKGLLD LGHAGKVGVS¹³⁰⁰
CTRLRLRLNK TAHQIKVQHF HQQLLRNAAW APLDLPSIVS EHLPMKQKRR¹³⁵⁰
FWKLVLVLPD VEEQTPESPG RILENWLKVK FTGDDSMVGD IGDNAGDIQT¹⁴⁰⁰
LSVFNTLSSK GDQTVSVNVC IKVAHGTLSL SALDAVETQK DLLGTSGML¹⁴⁵⁰
LLPPKVKSEE VAEELSWLS ALLQLKQLLQ AKPFQPALPL VVLVPSSRGD¹⁵⁰⁰
SAGRAVEDGL MLQDLVSAKL ISDYIVVEIP DSVNDLQGTV KVSQAVQWLI¹⁵⁵⁰
SGCPQALDFC CQTLVQYVED GISREFSRRF FHDRRERRLA SLPSQEPSTI¹⁶⁰⁰
IELFNSVLQF LASVVSSEQL CDISWPVMEF AEVGGSQLLP HLHWSPEHL¹⁶⁵⁰
AWLKQAVLGF QLPQMDLPPP GAPWLPVCSM VIQYTSQIPS SSQTQPVLOS¹⁷⁰⁰
QAENLLCRTY QKWKNKSLSP GQELGPSVAE IPWDDIITLC INHKLWDWTP¹⁷⁵⁰
PRLPVTLEAL SEDGQICVYF FKNLLRKYHV PSSWEQARMQ TQRELQLSHG¹⁸⁰⁰
RSGMRSIHPP TSTFPTPLLH VHKGKKKKEE SGREGSLSTE DLLRGASAE¹⁸⁵⁰
LLAQSLSSSL LEEKEENKRF EDQLQOWLSQ DSQAFTSTR LPLYLPQTLV¹⁹⁰⁰
SFPDSIKTQT MVKTSTSPQN SGTGKQLRFS EASGSSLTEK LKLLERLIQS¹⁹⁵⁰
SRAEEAASEL HLSALLEMVD M

◊ : 核局在化シグナル

◻ : 超コイル領域

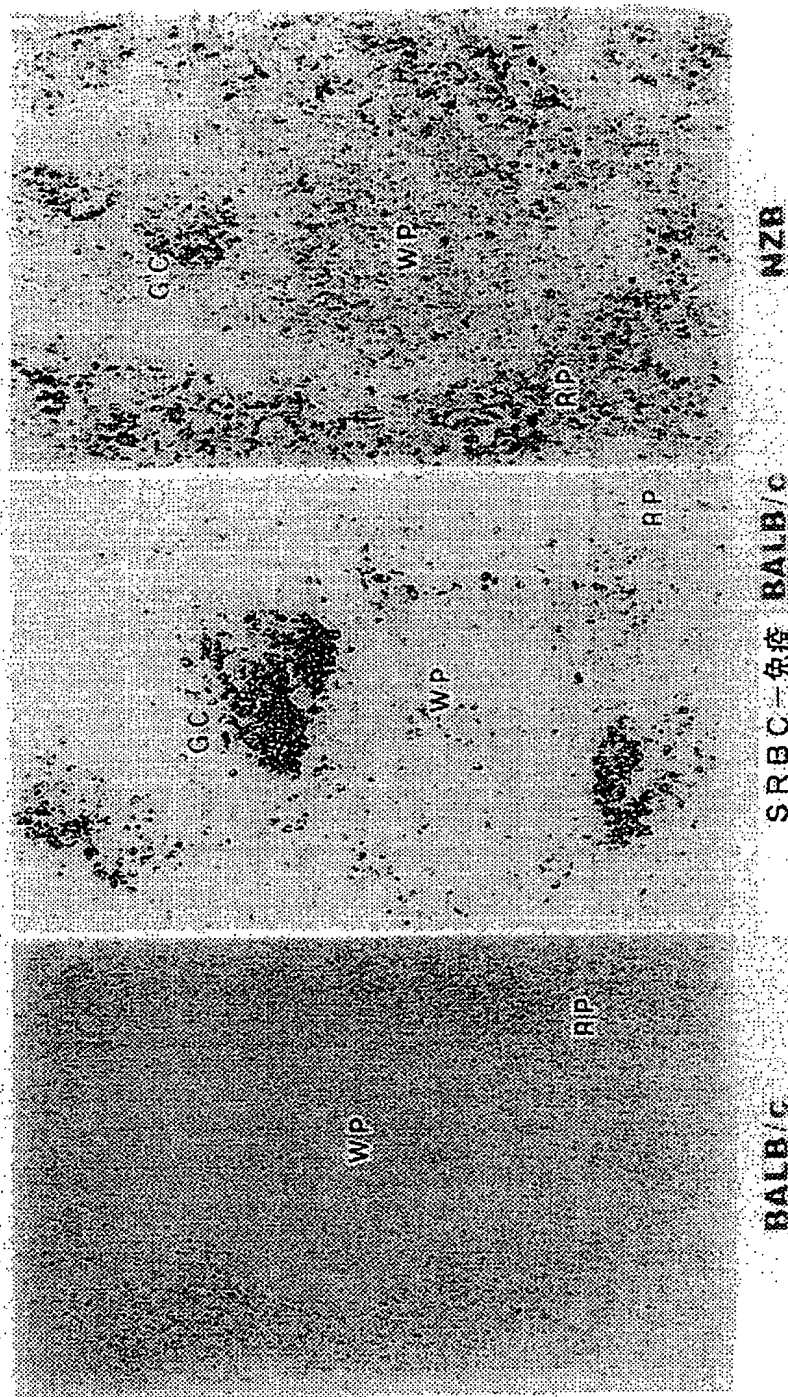
◼ : LXXLL モチーフ

S/T rich region

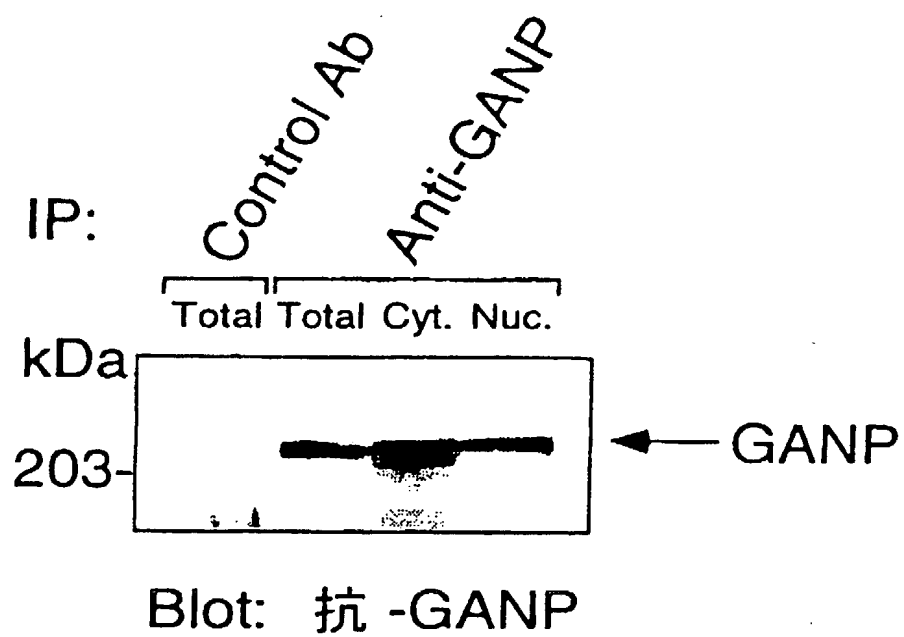
SAC3 homology region

第 1 1 図

Detection of gang transcript in GC by in situ hybridization



第 1 2 図



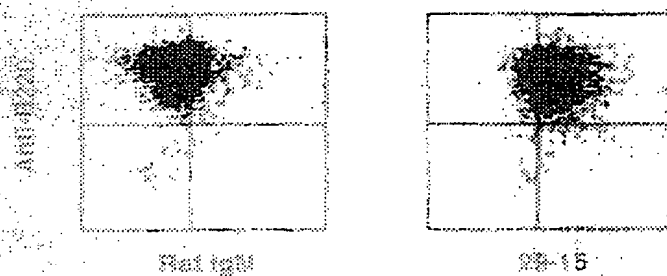
第 1 3 図

Increased expression of GANP antigen
by mitogenic stimulation *in vitro*

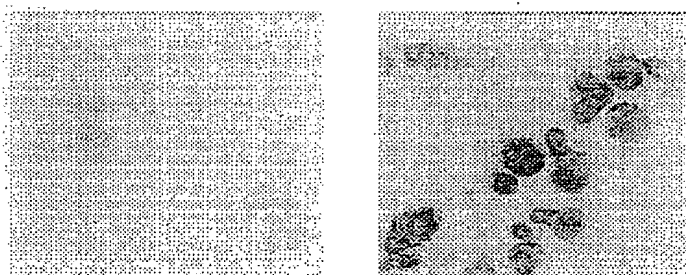
B

細胞質染色

Anti-IgM + Anti-CD40 刺激 (48hr)



免疫染色

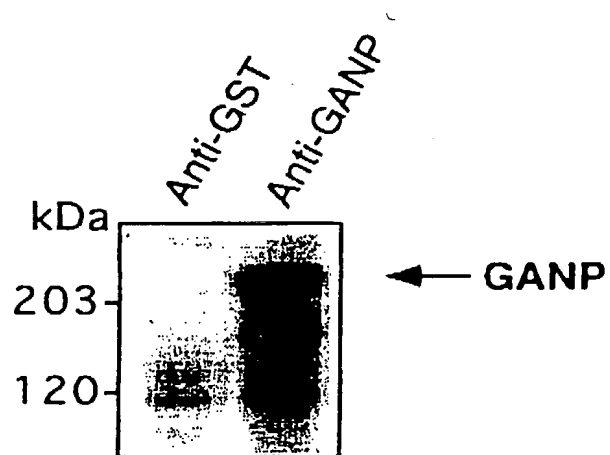


刺激なし

Anti-IgM + Anti-CD40
48hr 刺激

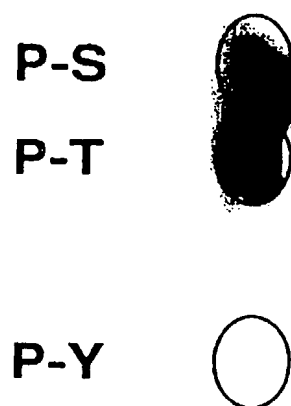
第 1 4 図

A



インビトロキナーゼアッセイ

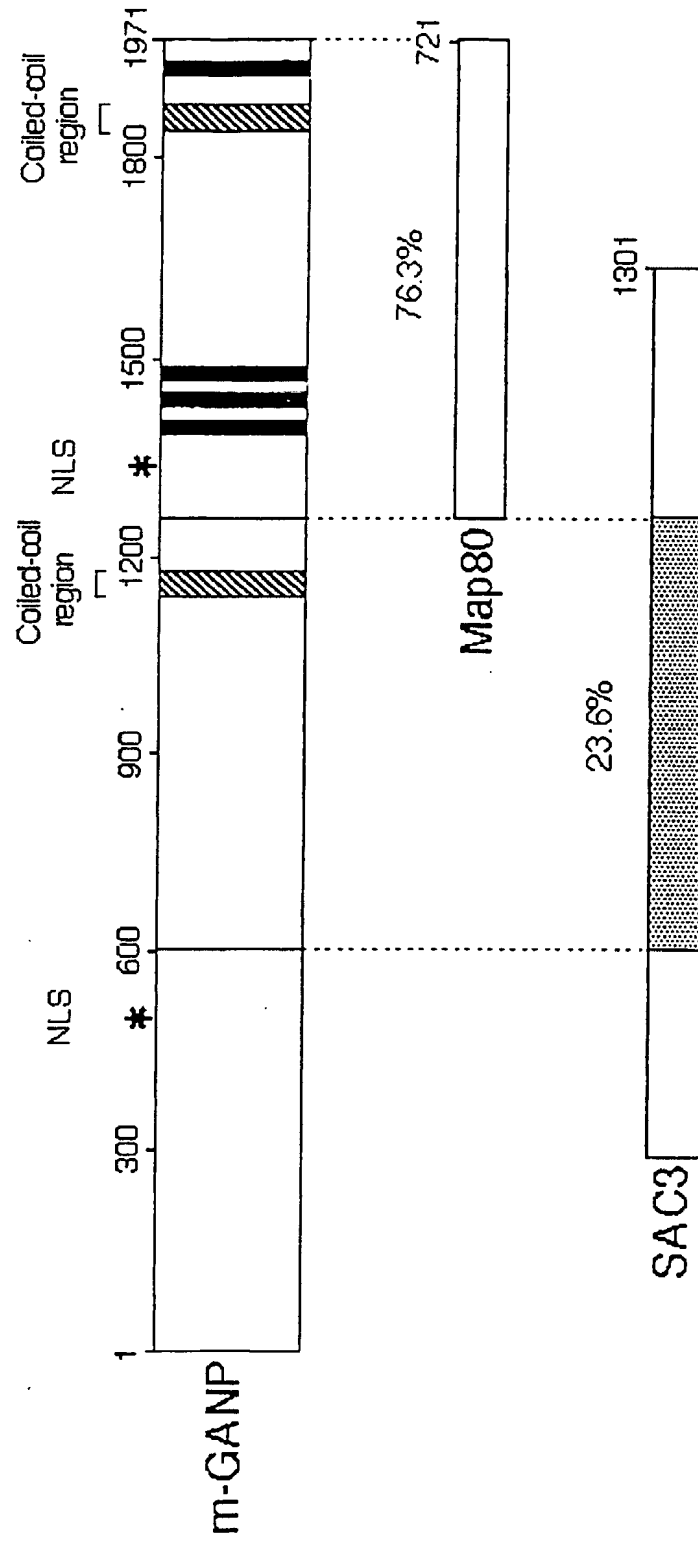
B



ホスホアミノ酸分析

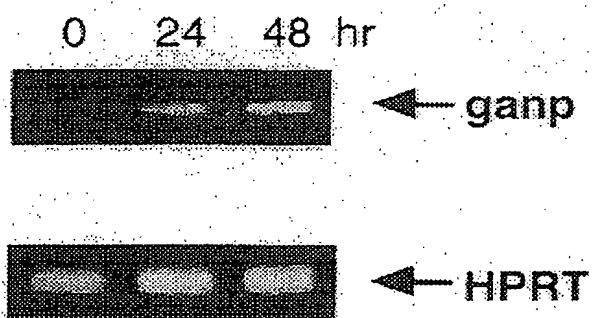
第 1 5 図

C



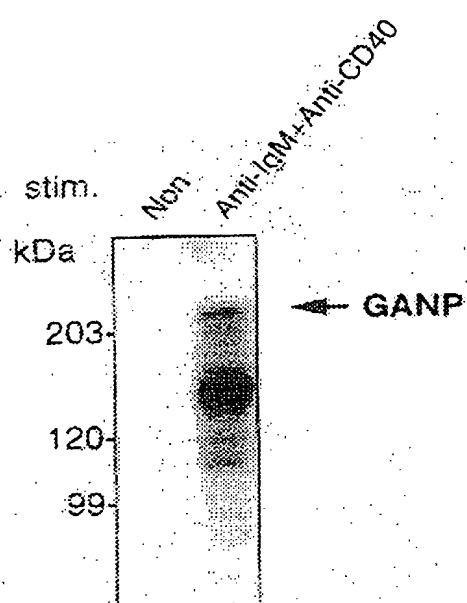
第 16 図

C

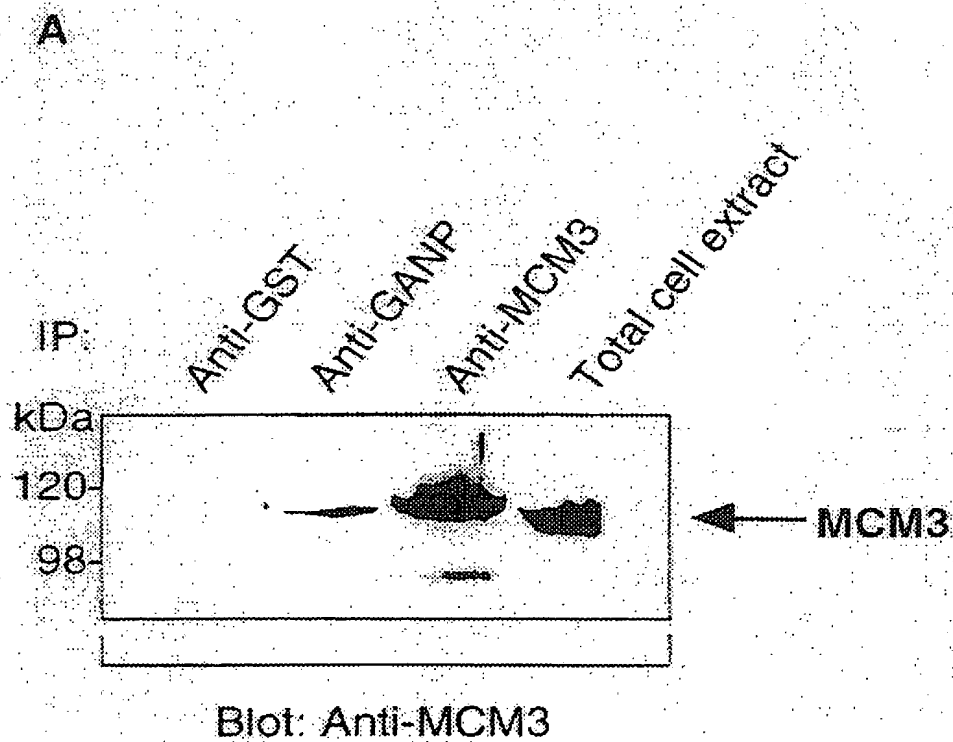


第 17 図

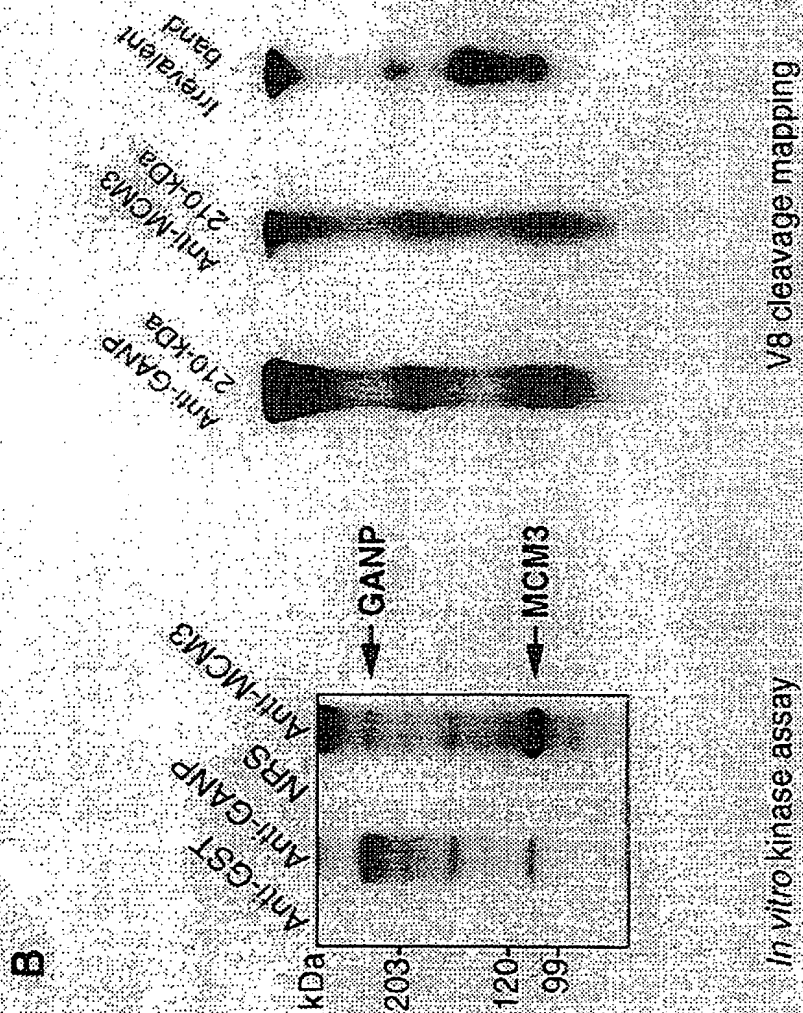
D



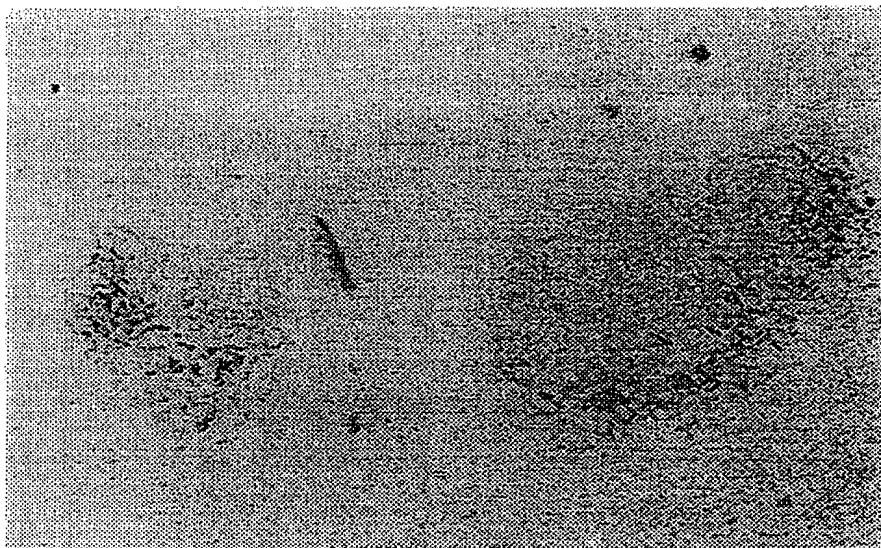
第 1 8 図



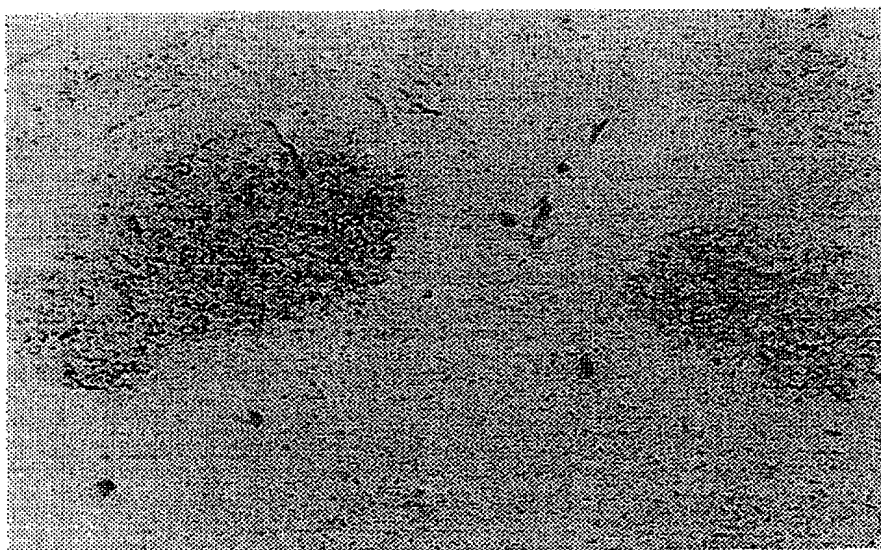
第 19 図



第 2 0 図



Anti-MCM3 (blue)
Anti-CR1 (brown)



Anti-MCM3 (blue)
PNA (brown)

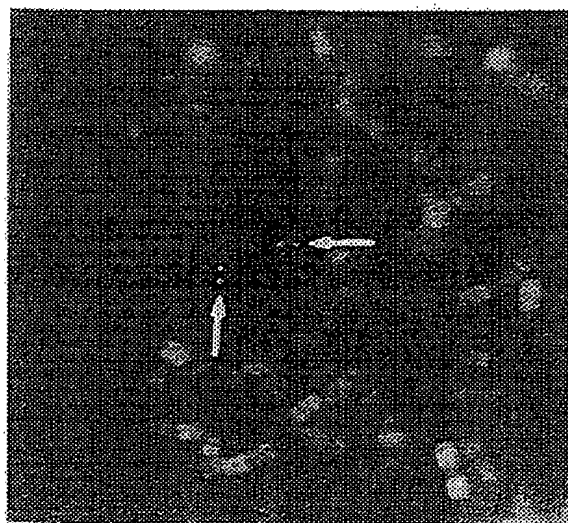
第 2 1 図 (A)

10	20	30	40	50	60
MNPTNPFSGQ	QPSAFSASSS	NVGTLPSPKP	FRFGQPSLFG	QNSTLSGKSS	GFSQVSSFFA
70	80	90	100	110	120
SSGVSHSSSV	QTLGFTQTSS	VGPFSGLEHT	STFVATSGPS	SSSVLGNTGF	SFKSPTSVGA
130	140	150	160	170	180
FPSTSAFGQE	AGEIVNSGFG	KTEFSFKPLE	NAVFKPILGA	ESEPEKTQSQ	IASGFFTFSH
190	200	210	220	230	240
PISSAPGGLA	PFSFPQVTSS	SATTSNFTFS	KPVSSNNSLS	AFTPALSNQN	VEEEKRGPKS
250	260	270	280	290	300
IFGSSNNSFS	SFPVSSAVLG	EPFQASKAGV	RQGCEEAVSQ	VEPLPSLMKG	LKRKEDQDRS
310	320	330	340	350	360
PRRHGHEPAE	DSDPLSRGDH	PPDKRPVRLN	RPRGGTLFGR	TIQDVFKSNK	EVGRLGNKEA
370	380	390	400	410	420
KKETGFVESA	ESDHMAIPGG	NQSVLAPSRI	PGVNKEEETE	SREKKEDSLR	GTPARQSNRS
430	440	450	460	470	480
ESTDSLGLLS	PSEVTAIQCK	NIPDYLNDRT	ILENHFGKIA	KVQRIFTRRS	KKLAVVHFFD
490	500	510	520	530	540
HASAAALARKK	GKSLHKDMAI	FWHRKKISPN	KKPFSLKEKK	PGDGEVSPST	EDAPFQHSPL
550	560	570	580	590	600
GKAAGRTGAS	SLLNKSSPVK	KPSLLKAHQF	EGDSFDSASE	GSEGLGPCVL	SLSTLIGTVA
610	620	630	640	650	660
ETSKEYRLL	DQRDRIMRQA	RVKRTDLDKA	RTFVGTCCLDM	CPEKERYMRE	TRSQLSVFEV
670	680	690	700	710	720
VPGTDQVDHA	AAVKEYSRSS	ADQEEPLPHE	LRPLPVLSRT	MDYLVTOIMD	QKEGSLRDWY
730	740	750	760	770	780
DFVWNRTGI	RKDITQOHL	DPLTVSLIEK	CTRFHIHCAH	FMCEEPMSSE	DAKINNENMT
790	800	810	820	830	840
KCLQSLKEMY	QDLRNKGVC	ASEAEFQGYN	VLLSLNKGDI	LREVQQFHPA	VRNSSEVKFA
850	860	870	880	890	900
VQAFALNSN	NFVRFFKLQV	SASYLNACLL	HCYFSQIRKD	ALRALNFAYT	VSTQSTIFP
910	920	930	940	950	960
LDGVVRMLLF	RDCEEATDFL	TCHGLTVSDG	CVELNRS AFL	EPEGLSKTRK	SVFITRKLTV
970	980	990	1000	1010	1020
SVGEIVNGGP	LPPVPRHTPV	CSFNSQNKYI	GESLAAELPV	STQRP GS DTV	GGGRGEECGV
1030	1040	1050	1060	1070	1080
EPDAPLSSLP	QSLPAPAPSP	VPLPPVLALT	PSVAPSLFQL	SVQPEPPPPE	PVPMYSDDEL
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AQVVDELIQE	ALQRDCEEVG	SAGAAAYAAA	LGVSNAAMED	LLTAATTGIL	RHIAAEEVSK
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ERERREQERQ	RAEEERLKQE	RELVLSLSQ	GLAVELMERV	MMEFVRETCS	QELKNAVETD
1210	1220	1230	1240	1250	1260
QRVRVARCCE	DVCAHLVDLF	LVEEIFQTAK	ETLQELQCFC	KYLQRWREAV	TARKKLRRQM

第 2 1 図 (B)

1270	1280	1290	1300	1310	1320
RAFPAPCCV	DVSDRLRALA	PSAECPIAEE	NLARGLLDLG	HAGRLGISCT	RLRRLRNKTA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
HQMKVQHFYQ	QLLSDDAWAS	LDLPSLVAEH	LPGRQEHVFW	KLVLVLPDVE	EQSPESCGRI
1390	1400	1410	1420	1430	1440
LANWLKVKFM	GDEGSVDDTS	SDAGGIQTLS	LFNSLSKSGD	QMISVNVCIK	VAHGALSDGA
1450	1460	1470	1480	1490	1500
IDAVETQKDL	LGASGLMLLL	PPKMKSEDMA	EEDVYWLSAL	LQLKQLLOAK	PFQPALPLVV
1510	1520	1530	1540	1550	1560
LVPSPGGDAV	EKEVEDGLML	QDLVSAKLIS	DYTVTEIPDT	INDLQGSTKV	LQAVQWLVS
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CPHSLDLCCQ	TLIQYVEDGI	GHEFSGRFFH	DRRERRLGGL	ASQEPGAIIE	LFNSVLQFLA
1630	1640	1650	1660	1670	1680
SVVSSEQLCD	LSWPVTEFAE	AGGSRLPHL	HWNAPEHLAW	LKQAVLGFQL	PQMDLPPLGA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
PWLPVCSMVV	QYASQIPSSR	QTQPVLQSQV	ENLLHRTYCR	WKS KSPSPVH	GAGPSVMEIP
1750	1760	1770	1780	1790	1800
WDDLIALCIN	HKLRDWTTPR	LPVTSEALSE	DGQICVYFFK	NDLKKYDVPL	SWEQARLQTQ
1810	1820	1830	1840	1850	1860
KELQLREGRL	AIKPFHPSAN	NFPIPLLHMH	RNWKRSTECA	QEGRIPISTED	LMRGASAEEL
1870	1880	1890	1900	1910	1920
LAQCLSSSL	LEKEENKRFE	DQLQQWLSED	SGAFTDLTSL	PLYLPQTLVS	LSHTIEPVMK
1930	1940	1950	1960	1970	1980
TSVTTSPQSD	MMREQLQLSE	ATGTCLGERL	KHLERLIRSS	REEEVASELH	LSALLDMVDI

第 2 2 図



SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Electric Industries, Ltd.

<120> GANP protein

<130> 99266M

<160> 9

<210> 1

<211> 1971

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met His Pro Val Asn Pro Phe Gly Gly Ser Ser Pro Ser Ala Phe Ala
 1 5 10 15
 Val Ser Ser Ser Thr Thr Gly Thr Tyr Gln Thr Lys Ser Pro Phe Arg
 20 25 30
 Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Pro Ser Lys Ser
 35 40 45
 Leu Ala Phe Ser Gln Val Pro Ser Phe Ala Thr Pro Ser Gly Gly Ser
 50 55 60
 His Ser Ser Ser Leu Pro Ala Phe Gly Leu Thr Gln Thr Ser Ser Val
 65 70 75 80
 Gly Leu Phe Ser Ser Leu Glu Ser Thr Pro Ser Phe Ala Ala Thr Ser
 85 90 95
 Ser Ser Ser Val Pro Gly Asn Thr Ala Phe Ser Phe Lys Ser Thr Ser
 100 105 110
 Ser Val Gly Val Phe Pro Ser Gly Ala Thr Phe Gly Pro Glu Thr Gly
 115 120 125
 Glu Val Ala Gly Ser Gly Phe Arg Lys Thr Glu Phe Lys Phe Lys Pro

130 135 140
Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Pro Gly Pro Glu Ser Glu Pro
145 150 155 160
Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ser Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ser His
165 170 175
Pro Val Gly Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Pro Phe Ser Phe Pro Gln
180 185 190
Val Thr Asn Ser Ser Val Thr Ser Ser Ser Phe Ile Phe Ser Lys Pro
195 200 205
Val Thr Ser Asn Thr Pro Ala Phe Ala Ser Pro Leu Ser Asn Gln Asn
210 215 220
Val Glu Glu Glu Lys Arg Val Ser Thr Ser Ala Phe Gly Ser Ser Asn
225 230 235 240
Ser Ser Phe Ser Thr Phe Pro Thr Ala Ser Pro Gly Ser Leu Gly Glu
245 250 255
Pro Phe Pro Ala Asn Lys Pro Ser Leu Arg Gln Gly Cys Glu Glu Ala
260 265 270
Ile Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Thr Leu Met Lys Gly Leu Lys Arg
275 280 285
Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His Cys His Glu Ala Ala
290 295 300
Glu Asp Pro Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His Pro Pro Asp Lys Arg
305 310 315 320
Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr Leu Phe Gly Arg Thr
325 330 335
Ile Gln Glu Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Ala Gly Arg Leu Gly Ser
340 345 350

Lys Glu Ser Lys Glu Ser Gly Phe Ala Glu Pro Gly Glu Ser Asp His
355 360 365
Ala Ala Val Pro Gly Gly Ser Gln Ser Thr Met Val Pro Ser Arg Leu
370 375 380
Pro Ala Val Thr Lys Glu Glu Glu Glu Ser Arg Asp Glu Lys Glu Asp
385 390 395 400
Ser Leu Arg Gly Lys Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Arg Glu Glu Trp
405 410 415
Ile Tyr Ser Leu Gly Gly Val Ser Ser Leu Glu Leu Thr Ala Ile Gln
420 425 430
Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp Arg Ala Ile Leu Glu Lys
435 440 445
His Phe Ser Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg Val Phe Thr Arg Arg Ser
450 455 460
Lys Lys Leu Ala Val Ile His Phe Phe Asp His Ala Ser Ala Ala Leu
465 470 475 480
Ala Arg Lys Lys Gly Lys Gly Leu His Lys Asp Val Val Ile Phe Trp
485 490 495
His Lys Lys Lys Ile Ser Pro Ser Lys Lys Leu Phe Pro Leu Lys Glu
500 505 510
Lys Leu Gly Glu Ser Glu Ala Ser Gln Gly Ile Glu Asp Ser Pro Phe
515 520 525
Gln His Ser Pro Leu Ser Lys Pro Ile Val Arg Pro Ala Ala Gly Ser
530 535 540
Leu Leu Ser Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys Pro Ser Leu Leu Lys Met
545 550 555 560
His Gln Phe Glu Ala Asp Pro Phe Asp Ser Gly Ser Glu Gly Ser Glu

565	570	575
Gly Leu Gly Ser Cys Val Ser Ser Leu Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val		
580	585	590
Ala Asp Thr Ser Glu Glu Lys Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg		
595	600	605
Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg		
610	615	620
Ala Phe Val Gly Thr Cys Pro Asp Met Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr		
625	630	635
Leu Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val Phe Glu Val Val Pro Gly		
645	650	655
Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser		
660	665	670
Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His Glu Leu Arg Pro Ser Ala		
675	680	685
Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val Thr Gln Ile Met Asp Gln		
690	695	700
Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr		
705	710	715
Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln His Leu Cys Asp Pro Leu		
725	730	735
Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg Phe His Ile His Cys Ala		
740	745	750
His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn		
755	760	765
Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln		
770	775	780

Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln
 785 790 795 800
 Gly Tyr Asn Val Leu Leu Asn Leu Asn Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu
 805 810 815
 Val Gln Gln Phe His Pro Asp Val Arg Asn Ser Pro Glu Val Asn Phe
 820 825 830
 Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe
 835 840 845
 Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Cys Leu Leu His
 850 855 860
 Cys Tyr Phe Asn Gln Ile Arg Lys Asp Ala Leu Arg Ala Leu Asn Val
 865 870 875 880
 Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr Val Phe Pro Leu Asp Gly
 885 890 895
 Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Ser Glu Glu Ala Thr Asn Phe
 900 905 910
 Leu Asn Tyr His Gly Leu Thr Val Ala Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn
 915 920 925
 Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu Cys Lys Ala Arg Lys Ser
 930 935 940
 Val Phe Ile Gly Arg Lys Leu Thr Val Ser Val Gly Glu Val Val Asn
 945 950 955 960
 Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His Thr Pro Val Cys Ser Phe
 965 970 975
 Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Val Gly Glu Ser Leu Ala Thr Glu Leu Pro
 980 985 990
 Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gly Gly Asp Pro Ala Gly Gly Gly Arg Gly

995	1000	1005	
Glu Asp Cys Glu Ala Glu Val Asp Leu Pro Thr Leu Ala Val Leu Pro			
1010	1015	1020	
Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ser Ala Thr Pro Ala Leu His Val Gln Pro			
1025	1030	1035	1040
Leu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ser Leu Leu Gln Ala Ser Thr Gln Pro			
1045	1050	1055	
Glu Val Leu Leu Pro Lys Pro Ala Pro Val Tyr Ser Asp Ser Asp Leu			
1060	1065	1070	
Val Gln Val Val Asp Glu Leu Ile Gln Glu Ala Leu Gln Val Asp Cys			
1075	1080	1085	
Glu Glu Val Ser Ser Ala Gly Ala Ala Tyr Val Ala Ala Ala Leu Gly			
1090	1095	1100	
Val Ser Asn Ala Ala Val Glu Asp Leu Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly			
1105	1110	1115	1120
Ile Leu Arg His Val Ala Ala Glu Glu Val Ser Met Glu Arg Gln Arg			
1125	1130	1135	
Leu Glu Glu Glu Lys Gln Arg Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys Gln Glu			
1140	1145	1150	
Arg Glu Leu Met Leu Thr Gln Leu Ser Glu Gly Leu Ala Ala Glu Leu			
1155	1160	1165	
Thr Glu Leu Thr Val Thr Glu Cys Val Trp Glu Thr Cys Ser Gln Glu			
1170	1175	1180	
Leu Gln Ser Ala Val Lys Ile Asp Gln Lys Val Arg Val Ala Arg Cys			
1185	1190	1195	1200
Cys Glu Ala Val Cys Ala His Leu Val Asp Leu Phe Leu Ala Glu Glu			
1205	1210	1215	

Ile Phe Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys
1220 1225 1230
Lys Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Lys Phe
1235 1240 1245
Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp Val
1250 1255 1260
Asn Asp Arg Leu Gln Ala Leu Val Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Thr
1265 1270 1275 1280
Glu Glu Asn Leu Ala Lys Gly Leu Leu Asp Leu Gly His Ala Gly Lys
1285 1290 1295
Val Gly Val Ser Cys Thr Arg Leu Arg Arg Leu Arg Asn Lys Thr Ala
1300 1305 1310
His Gln Ile Lys Val Gln His Phe His Gln Gln Leu Leu Arg Asn Ala
1315 1320 1325
Ala Trp Ala Pro Leu Asp Leu Pro Ser Ile Val Ser Glu His Leu Pro
1330 1335 1340
Met Lys Gln Lys Arg Arg Phe Trp Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp
1345 1350 1355 1360
Val Glu Glu Gln Thr Pro Glu Ser Pro Gly Arg Ile Leu Glu Asn Trp
1365 1370 1375
Leu Lys Val Lys Phe Thr Gly Asp Asp Ser Met Val Gly Asp Ile Gly
1380 1385 1390
Asp Asn Ala Gly Asp Ile Gln Thr Leu Ser Val Phe Asn Thr Leu Ser
1395 1400 1405
Ser Lys Gly Asp Gln Thr Val Ser Val Asn Val Cys Ile Lys Val Ala
1410 1415 1420
His Gly Thr Leu Ser Asp Ser Ala Leu Asp Ala Val Glu Thr Gln Lys

1425	1430	1435	1440
Asp Leu Leu Gly Thr Ser Gly Leu Met Leu Leu Leu Pro Pro Lys Val			
1445	1450	1455	
Lys Ser Glu Glu Val Ala Glu Glu Glu Leu Ser Trp Leu Ser Ala Leu			
1460	1465	1470	
Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu			
1475	1480	1485	
Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly Asp Ser Ala Gly Arg			
1490	1495	1500	
Ala Val Glu Asp Gly Leu Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Ala Lys Leu			
1505	1510	1515	1520
Ile Ser Asp Tyr Ile Val Val Glu Ile Pro Asp Ser Val Asn Asp Leu			
1525	1530	1535	
Gln Gly Thr Val Lys Val Ser Gly Ala Val Gln Trp Leu Ile Ser Gly			
1540	1545	1550	
Cys Pro Gln Ala Leu Asp Leu Cys Cys Gln Thr Leu Val Gln Tyr Val			
1555	1560	1565	
Glu Asp Gly Ile Ser Arg Glu Phe Ser Arg Arg Phe Phe His Asp Arg			
1570	1575	1580	
Arg Glu Arg Arg Leu Ala Ser Leu Pro Ser Gln Glu Pro Ser Thr Ile			
1585	1590	1595	1600
Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser			
1605	1610	1615	
Ser Glu Gln Leu Cys Asp Ile Ser Trp Pro Val Met Glu Phe Ala Glu			
1620	1625	1630	
Val Gly Gly Ser Gln Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn Ser Pro Glu			
1635	1640	1645	

His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu Pro Gln
 1650 1655 1660
 Met Asp Leu Pro Pro Pro Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val Cys Ser Met
 1665 1670 1675 1680
 Val Ile Gln Tyr Thr Ser Gln Ile Pro Ser Ser Ser Gln Thr Gln Pro
 1685 1690 1695
 Val Leu Gln Ser Gln Ala Glu Asn Leu Leu Cys Arg Thr Tyr Gln Lys
 1700 1705 1710
 Trp Lys Asn Lys Ser Leu Ser Pro Gly Gln Glu Leu Gly Pro Ser Val
 1715 1720 1725
 Ala Glu Ile Pro Trp Asp Asp Ile Ile Thr Leu Cys Ile Asn His Lys
 1730 1735 1740
 Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg Leu Pro Val Thr Leu Glu Ala Leu
 1745 1750 1755 1760
 Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys Val Tyr Phe Phe Lys Asn Leu Leu Arg
 1765 1770 1775
 Lys Tyr His Val Pro Ser Ser Trp Glu Gln Ala Arg Met Gln Thr Gln
 1780 1785 1790
 Arg Glu Leu Gln Leu Ser His Gly Arg Ser Gly Met Arg Ser Ile His
 1795 1800 1805
 Pro Pro Thr Ser Thr Phe Pro Thr Pro Leu Leu His Val His Gln Lys
 1810 1815 1820
 Gly Lys Lys Lys Glu Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ser Leu Ser Thr Glu
 1825 1830 1835 1840
 Asp Leu Leu Arg Gly Ala Ser Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gln Ser Leu
 1845 1850 1855
 Ser Ser Ser Leu Leu Glu Glu Lys Glu Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp

1860	1865	1870	
Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser Gln Asp Ser Gln Ala Phe Thr Glu Ser			
1875	1880	1885	
Thr Arg Leu Pro Leu Tyr Leu Pro Gln Thr Leu Val Ser Phe Pro Asp			
1890	1895	1900	
Ser Ile Lys Thr Gln Thr Met Val Lys Thr Ser Thr Ser Pro Gln Asn			
1905	1910	1915	1920
Ser Gly Thr Gly Lys Gln Leu Arg Phe Ser Glu Ala Ser Gly Ser Ser			
1925	1930	1935	
Leu Thr Glu Lys Leu Lys Leu Leu Glu Arg Leu Ile Gln Ser Ser Arg			
1940	1945	1950	
Ala Glu Glu Ala Ala Ser Glu Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Glu Met			
1955	1960	1965	
Val Asp Met			

1970

<210> 2

<211> 6429

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

gttgcggtgc ggtgggcccg gtagaggctg cacgcagact gtgggcgagc acaagcgctg	60
gcgacagtgg ccgtatctgg cggacttgct cctccctccg cggcctccgc tgtcccttgt	120
gtctttgccg agttgctgaa ggccttcact agtcttcgct cgaaggcgctc tgtaacctta	180
gcggccggct tccggagtgt taagcatcgg ggataaaaag ctattatttc tagaccaggg	240
catcgcaagt tcgagttacc gggagaaaaa tgagatggtc atcctgagga tgaaggagag	300
cttcccctgg caacagataa tttaaagagg agagctactt gtgtatagtc cataattatt	360
gccttcagat aattggcttg aag atg cac ccg gtg aac ccc ttc gga ggc agc	413

agc cca agt gct ttt gcg gta tct tcc agc acc acg gga aca tat cag	461
act aaa tca cca ttt cga ttt ggc cag cct tcc ctt ttt gga cag aac	509
agc aca ccc agc aag agc ctg gcg ttt tca caa gta cca agc ttt gca	557
aca ccc tct gga gga agc cat tct tcc tcc ttg cca gca ttt gga ctc	605
acc caa acc tca agt gtg gga ctc ttc tct agt ctc gaa tcc aca cct	653
tct ttc gca gct act tcg agt tcc tct gtg ccc ggc aat acg gca ttc	701
agc ttt aag tca acc tct agc gtt ggg gtt ttc cca agt ggc gct act	749
ttt ggg cca gaa acc gga gaa gta gca ggt tct ggc ttt cgg aag acg	797
gaa ttc aag ttt aaa cct ctg gaa aat gca gtc ttc aaa ccg ata ccg	845
ggg cct gag tca gag cca gaa aaa acc cag agc cag att tct tct gga	893
ttt ttt aca ttt tcc cat ccc gtt ggt agc ggg tct gga ggc ctg acc	941
cct ttt tct ttc cca cag gtg aca aat agt tcg gtg act agc tca agt	989
ttt atc ttt tcg aaa cca gtt act agt aat act cct gcc ttt gcc tct	1037
cct ttg tct aac caa aat gta gaa gaa gag aag agg gtt tct acg tca	1085
gcg ttt gga agc tca aac agt agc ttc agt act ttc ccc aca gcg tca	1133
cca gga tct ttg ggg gag ccc ttc cca gct aac aaa cca agc ctc cgc	1181
caa gga tgt gag gaa gcc atc tcc cag gtg gag cca ctt ccc acc ctc	1229
atg aag gga tta aag agg aaa gag gac cag gat cgc tcc ccg agg aga	1277
cat tgc cac gag gca gca gaa gac cct gat ccc ctg tcc agg ggc gac	1325
cat ccc cca gat aaa cgg cca gtc cgc ctc aac aga ccc cgg gga ggt	1373
act ttg ttt ggc cgg aca ata cag gag gtc ttc aaa agc aat aaa gag	1421
gca ggc cgc ctg ggc agc aag gaa tcc aag gag agt ggc ttt gcg gaa	1469
cct ggg gaa agt gac cac gcg gcc gtc cca gga ggg agt cag tcc acc	1517
atg gta cct tcc cgc ctt cca gct gtg act aaa gag gaa gaa gaa agt	1565
aga gat gag aaa gaa gat tct ctc agg gga aag tct gtg cgc cag agt	1613
aag cga agg gaa gag tgg atc tac agc ctc ggg ggc gtg tct tct tta	1661
gag ctc aca gcc atc cag tgc aag aac atc ccc gac tac ctc aac gac	1709

aga gcc atc ctg gag aaa cac ttc agc aaa atc gct aaa gtc cag cgg	1757
gtc ttc acc aga cgc agc aag aag ctc gcc gtg att cat ttt ttc gac	1805
cac gca tcg gca gcc ctg gct agg aag aag ggg aaa ggt ctg cat aag	1853
gac gtg gtt atc ttt tgg cac aag aag aaa ata agt ccc agc aag aaa	1901
ctc ttt ccc ctg aag gag aag ctt ggt gag agt gaa gcc agc cag ggc	1949
atc gag gac tcc ccc ttt cag cac tcg cct ctc agc aag ccc atc gtg	1997
agg cct gca gcc ggc agc ctc ctc agc aaa agc tct cca gtg aag aag	2045
ccg agt ctt ctg aag atg cac cag ttt gag gcg gat cct ttt gac tct	2093
gga tct gag ggc tcc gag ggc ctt ggt tct tgc gtg tca tct ctt agc	2141
acc ctg ata ggg act gtg gca gac aca tct gag gag aag tac cgc ctt	2189
ctg gac cag aga gac cgc atc atg cgg caa gct cga gtg aag agg acg	2237
gac ctg gac aaa gcc agg gca ttt gtt ggg act tgc cct gac atg tgt	2285
ccc gag aag gag cgg tac ttg agg gag acc cgg agc cag ctg agc gtg	2333
ttt gaa gtt gtc cca ggg act gac cag gtg gac cat gca gca gcc gtg	2381
aag gag tac agc cgg tcc tct gca gat cag gag gag ccc ctg cca cat	2429
gag ctg aga ccc tca gca gtt ctc agc agg acc atg gac tac ctg gtg	2477
acc cag atc atg gac caa aag gaa ggc agc ctt cgg gat tgg tat gac	2525
ttc gtg tgg aac cgc acc cgg ggt ata cgg aag gac ata aca cag cag	2573
cac ctc tgt gat ccc ctg acg gtg tct ctg atc gag aag tgt acc cga	2621
ttt cac att cac tgt gcc cac ttt atg tgt gag gag cct atg tct tcc	2669
ttt gat gcc aag atc aac aat gag aac atg acc aag tgt cta cag agt	2717
ctg aag gag atg tac cag gac ctg agg aac aag ggt gtt ttt tgt gcc	2765
agt gaa gca gag ttt cag ggc tac aat gtc ctg ctt aat ctc aac aaa	2813
gga gac att ttg aga gaa gtg cag cag ttc cac cct gac gtt agg aac	2861
tcc cca gag gtg aac ttc gct gtc cag gct ttt gct gca ttg aac agc	2909
aat aat ttt gtg aga ttt ttc aaa ctg gtt cag tca gct tct tac ctg	2957
aat gcg tgc ctg tta cac tgt tac ttt aat cag atc cgc aag gat gcc	3005

ctc cgg gca ctc aat gtt gct tat act gta agc aca cag cgc tct acc	3053
gtc ttc ccc ctg gat ggt gtc gtc cgc atg ctg ctg ttc aga gat agt	3101
gaa gag gcg aca aac ttc ctc aat tac cat ggc ctc act gta gct gat	3149
ggc tgt gtt gag ctg aat cgg tcg gca ttc ttg gaa ccg gag gga tta	3197
tgc aag gcc agg aag tca gtg ttt att ggc cgg aag ctg acg gtg tca	3245
gtt ggg gaa gtt gtg aat gga ggg ccg ttg ccc cct gtt cct cgc cat	3293
aca cct gtg tgc agc ttc aac tcc cag aat aag tac gtt gga gag agc	3341
ctg gct acg gag ctg ccc atc agc act cag aga gct ggt gga gac cca	3389
gca ggt ggt ggc aga gga gag gac tgt gag gca gag gtg gac ttg cca	3437
aca ttg gcg gtc ctc cca cag ccg cct cct gca tcc tca gcc acg ccg	3485
gcg ctt cat gtc cag cca ctg gcc cca gcc gca gca ccc agc ctt ctc	3533
cag gcc tcc acg cag cct gag gtg ctg ctt cca aag cct gcg cct gtg	3581
tac tct gac tcg gac ctg gta cag gtg gtg gac gag ctc atc cag gag	3629
gct ctg caa gtg gac tgt gag gaa gtc agc tcc gct ggg gca gcc tac	3677
gta gcc gca gct ctg ggc gtt tcc aat gct gct gtg gag gat ctg att	3725
act gct gcg acc acg ggc att ctg agg cac gtt gcc gct gag gaa gtt	3773
tcc atg gaa agg cag aga cta gag gaa gag aag caa cga gct gag gag	3821
gaa cgg ttg aag caa gag aga gaa ctg atg tta act cag ctg agc gag	3869
ggt ctg gcc gca gag ctg aca gaa ctc acg gtg aca gag tgt gtg tgg	3917
gaa acc tgc tct cag gag cta cag agt gca gta aaa ata gac cag aag	3965
gtc cgt gtg gcc cgc tgt tgt gaa gcc gtc tgt gca cac ctg gtg gat	4013
ttg ttt ctt gct gag gaa att ttc cag act gca aaa gag aca ctc cag	4061
gaa ctc cag tgt ttc tgc aag tat cta caa cgg tgg agg gag gct gtt	4109
gca gct cgg aag aaa ttc cgg cgt cag atg cgg gcc ttc cct gca gcg	4157
cca tgc tgt gtg gat gtg aat gac cgg ctg cag gca cta gtg ccc agc	4205
gca gag tgc ccc att act gag gag aac ctg gcc aag ggt ctt ttg gac	4253
ctg ggc cac gca ggc aaa gta ggc gtc tcc tgt acc agg ttg agg cgg	4301

ctt aga aac aag aca gct cac cag ata aag gtc cag cac ttc cac cag 4349
cag ctg ctg agg aat gct gca tgg gca cct ctg gac ctg cca tcc att 4397
gtg tct gag cac ctc ccc atg aag cag aag cga agg ttt tgg aaa ctg 4445
gtg ctg gtg ttg cct gat gtg gaa gag cag act cca gag agt cct ggc 4493
aga ata cta gaa aac tgg cta aag gtc aaa ttc aca gga gat gac agc 4541
atg gtg ggt gac ata gga gat aat gct ggt gat atc cag acc ctc tca 4589
gtc ttt aat aca ctt agt agt aaa ggg gat caa aca gtt tct gtc aac 4637
gtg tgt ata aag gtg gct cat ggc acc ctt agt gac agt gcc ctt gat 4685
gct gtg gag acc cag aag gac ctg ttg gga acc agt ggg ctc atg ctg 4733
ctg ctt ccc ccg aaa gtg aag agt gag gag gtg gca gag gag gaa ctg 4781
tcc tgg ctg tgc gct tta ctg cag ctc aag cag ctt ctg cag gcc aag 4829
ccc ttc cag cct gcc ctg ccg ctg gtg gtc ctc gtg ccc agc tcc aga 4877
ggg gac tcc gcg ggg agg gca gta gag gac ggt ctg atg tta cag gat 4925
ttg gtt tca gcc aag ctg att tcc gat tac att gtt gtt gag att cct 4973
gac tct gtt aat gat tta caa ggc aca gtg aag gtt tct gga gca gtc 5021
cag tgg ctg atc tcc gga tgt cct caa gcc cta gac ctt tgc tgc cag 5069
acc ctt gtt cag tat gtt gag gat ggg atc agc cgc gag ttc agc cgt 5117
cgg ttt ttc cac gac agg aga gag agg cgc ctg gct agc ctg ccc tcc 5165
cag gag cct agc acc att att gag ttg ttc aac agt gtg ctg cag ttc 5213
ctg gcc tct gtg gta tcc tct gag cag ctg tgt gac atc tcc tgg cct 5261
gtc atg gaa ttt gcc gaa gtg gga ggc agc cag ctg ctt cct cac ctg 5309
cac tgg aac tca cca gag cat cta gcg tgg ctg aaa caa gct gtg ctt 5357
ggg ttc cag ctt cca cag atg gac ctt cca ccc cca ggg gcc ccc tgg 5405
ctc cct gtg tgt tcc atg gtc att cag tac acc tcc cag att ccc agc 5453
tca agc cag aca cag cct gtc ctc cag tcc cag gcg gag aac ctg ctg 5501
tgc aga aca tac cag aag tgg aag aac aag agc ctc tct cca ggc cag 5549
gag ttg ggg cct tct gtt gcc gag atc ccg tgg gat gac atc atc acc 5597

tta tgc atc aat cat aag ctg agg gac tgg aca ccc ccc agg ctc cct 5645
 gtc aca tta gag gcg ctg agt gaa gat ggt caa ata tgt gtg tat ttt 5693
 ttc aaa aac ctt tta aga aaa tac cac gtt ccc tcg tca tgg gaa cag 5741
 gcc aga atg cag acg cag cgg gaa ctg cag ctg agt cat gga cgt tcg 5789
 ggg atg agg tcc atc cat cct cct aca agc act ttt cct act cca ttg 5837
 ctt cat gta cac cag aaa ggg aag aaa aag gaa gag agt ggc cga gag 5885
 ggg agc ctc agt aca gag gac ctc ctg cgg ggg gct tct gca gaa gag 5933
 ctc ctg gca cag agt ctg tcc agc agt ctt ctg gaa gag aag gaa gag 5981
 aac aag agg ttt gaa gat caa ctt cag cag tgg tta tcg caa gac tca 6029
 cag gca ttc aca gag tca act cgg ctt cct ctc tac ctc cct cag acg 6077
 cta gtg tcc ttt cct gat tct atc aaa act cag acc atg gtg aaa aca 6125
 tct aca agt cct cag aat tca gga aca gga aag cag ttg agg ttc tca 6173
 gag gca tcc ggt tca tcc ctg acg gaa aag ctg aag ctc ctg gaa agg 6221
 ctg atc cag agc tca agg gcg gaa gaa gca gcc tcc gag ctg cac ctc 6269
 tct gca ctg ctg gag atg gtg gac atg tag ctgtctgacg ggagacggat 6319
 ctctaattca taatgctttg tctgtattca attgtgttat agatgctggt ggaaatgtga 6379
 ctattaatta tgcaataaaa ctttttgaat cattccaaaa aaaaaacat 6429

<210> 3

<211> 1980

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Met Asn Pro Thr Asn Pro Phe Ser Gly Gln Gln Pro Ser Ala Phe Ser

1

5

10

15

Ala Ser Ser Ser Asn Val Gly Thr Leu Pro Ser Lys Pro Pro Phe Arg

20

25

30

Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Leu Ser Gly Lys

35 40 45
Ser Ser Gly Phe Ser Gln Val Ser Ser Phe Pro Ala Ser Ser Gly Val
50 55 60
Ser His Ser Ser Ser Val Gln Thr Leu Gly Phe Thr Gln Thr Ser Ser
65 70 75 80
Val Gly Pro Phe Ser Gly Leu Glu His Thr Ser Thr Phe Val Ala Thr
85 90 95
Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Val Leu Gly Asn Thr Gly Phe Ser Phe
100 105 110
Lys Ser Pro Thr Ser Val Gly Ala Phe Pro Ser Thr Ser Ala Phe Gly
115 120 125
Gln Glu Ala Gly Glu Ile Val Asn Ser Gly Phe Gly Lys Thr Glu Phe
130 135 140
Ser Phe Lys Pro Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Leu Gly Ala
145 150 155 160
Glu Ser Glu Pro Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ala Ser Gly Phe Phe
165 170 175
Thr Phe Ser His Pro Ile Ser Ser Ala Pro Gly Gly Leu Ala Pro Phe
180 185 190
Ser Phe Pro Gln Val Thr Ser Ser Ser Ala Thr Thr Ser Asn Phe Thr
195 200 205
Phe Ser Lys Pro Val Ser Ser Asn Asn Ser Leu Ser Ala Phe Thr Pro
210 215 220
Ala Leu Ser Asn Gln Asn Val Glu Glu Glu Lys Arg Gly Pro Lys Ser
225 230 235 240
Ile Phe Gly Ser Ser Asn Asn Ser Phe Ser Ser Phe Pro Val Ser Ser
245 250 255

Ala Val Leu Gly Glu Pro Phe Gln Ala Ser Lys Ala Gly Val Arg Gln
260 265 270
Gly Cys Glu Glu Ala Val Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Ser Leu Met
275 280 285
Lys Gly Leu Lys Arg Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His
290 295 300
Gly His Glu Pro Ala Glu Asp Ser Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His
305 310 315 320
Pro Pro Asp Lys Arg Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr
325 330 335
Leu Phe Gly Arg Thr Ile Gln Asp Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Val
340 345 350
Gly Arg Leu Gly Asn Lys Glu Ala Lys Lys Glu Thr Gly Phe Val Glu
355 360 365
Ser Ala Glu Ser Asp His Met Ala Ile Pro Gly Gly Asn Gln Ser Val
370 375 380
Leu Ala Pro Ser Arg Ile Pro Gly Val Asn Lys Glu Glu Glu Thr Glu
385 390 395 400
Ser Arg Glu Lys Lys Glu Asp Ser Leu Arg Gly Thr Pro Ala Arg Gln
405 410 415
Ser Asn Arg Ser Glu Ser Thr Asp Ser Leu Gly Gly Leu Ser Pro Ser
420 425 430
Glu Val Thr Ala Ile Gln Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp
435 440 445
Arg Thr Ile Leu Glu Asn His Phe Gly Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg
450 455 460
Ile Phe Thr Arg Arg Ser Lys Lys Leu Ala Val Val His Phe Phe Asp

465 470 475 480
His Ala Ser Ala Ala Leu Ala Arg Lys Lys Gly Lys Ser Leu His Lys
 485 490 495
Asp Met Ala Ile Phe Trp His Arg Lys Lys Ile Ser Pro Asn Lys Lys
 500 505 510
Pro Phe Ser Leu Lys Glu Lys Lys Pro Gly Asp Gly Glu Val Ser Pro
 515 520 525
Ser Thr Glu Asp Ala Pro Phe Gln His Ser Pro Leu Gly Lys Ala Ala
 530 535 540
Gly Arg Thr Gly Ala Ser Ser Leu Leu Asn Lys Ser Ser Pro Val Lys
545 550 555 560
Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala His Gln Phe Glu Gly Asp Ser Phe Asp
 565 570 575
Ser Ala Ser Glu Gly Ser Glu Gly Leu Gly Pro Cys Val Leu Ser Leu
 580 585 590
Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val Ala Glu Thr Ser Lys Glu Lys Tyr Arg
 595 600 605
Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg
 610 615 620
Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg Thr Phe Val Gly Thr Cys Leu Asp Met
625 630 635 640
Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr Met Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser
 645 650 655
Val Phe Glu Val Val Pro Gly Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala
 660 665 670
Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro
 675 680 685

His Glu Leu Arg Pro Leu Pro Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu
690 695 700
Val Thr Gln Ile Met Asp Gln Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr
705 710 715 720
Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln
725 730 735
Gln His Leu Cys Asp Pro Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr
740 745 750
Arg Phe His Ile His Cys Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser
755 760 765
Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln
770 775 780
Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys
785 790 795 800
Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Ser Leu Asn
805 810 815
Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu Val Gln Gln Phe His Pro Ala Val Arg
820 825 830
Asn Ser Ser Glu Val Lys Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn
835 840 845
Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr
850 855 860
Leu Asn Ala Cys Leu Leu His Cys Tyr Phe Ser Gln Ile Arg Lys Asp
865 870 875 880
Ala Leu Arg Ala Leu Asn Phe Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser
885 890 895
Thr Ile Phe Pro Leu Asp Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp

900	905	910	
Cys Glu Glu Ala Thr Asp Phe Leu Thr Cys His Gly Leu Thr Val Ser			
915	920	925	
Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly			
930	935	940	
Leu Ser Lys Thr Arg Lys Ser Val Phe Ile Thr Arg Lys Leu Thr Val			
945	950	955	960
Ser Val Gly Glu Ile Val Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg			
965	970	975	
His Thr Pro Val Cys Ser Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Ile Gly Glu			
980	985	990	
Ser Leu Ala Ala Glu Leu Pro Val Ser Thr Gln Arg Pro Gly Ser Asp			
995	1000	1005	
Thr Val Gly Gly Gly Arg Gly Glu Glu Cys Gly Val Glu Pro Asp Ala			
1010	1015	1020	
Pro Leu Ser Ser Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro			
1025	1030	1035	1040
Val Pro Leu Pro Pro Val Leu Ala Leu Thr Pro Ser Val Ala Pro Ser			
1045	1050	1055	
Leu Phe Gln Leu Ser Val Gln Pro Glu Pro Pro Pro Pro Glu Pro Val			
1060	1065	1070	
Pro Met Tyr Ser Asp Glu Asp Leu Ala Gln Val Val Asp Glu Leu Ile			
1075	1080	1085	
Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Cys Glu Glu Val Gly Ser Ala Gly Ala			
1090	1095	1100	
Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Asn Ala Ala Met Glu Asp			
1105	1110	1115	1120

Leu Leu Thr Ala Ala Thr Thr Gly Ile Leu Arg His Ile Ala Ala Glu
1125 1130 1135
Glu Val Ser Lys Glu Arg Glu Arg Arg Glu Gln Glu Arg Gln Arg Ala
1140 1145 1150
Glu Glu Glu Arg Leu Lys Gln Glu Arg Glu Leu Val Leu Ser Glu Leu
1155 1160 1165
Ser Gln Gly Leu Ala Val Glu Leu Met Glu Arg Val Met Met Glu Phe
1170 1175 1180
Val Arg Glu Thr Cys Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ala Val Glu Thr Asp
1185 1190 1195 1200
Gln Arg Val Arg Val Ala Arg Cys Cys Glu Asp Val Cys Ala His Leu
1205 1210 1215
Val Asp Leu Phe Leu Val Glu Glu Ile Phe Gln Thr Ala Lys Glu Thr
1220 1225 1230
Leu Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys Lys Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu
1235 1240 1245
Ala Val Thr Ala Arg Lys Lys Leu Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe Pro
1250 1255 1260
Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp Val Ser Asp Arg Leu Arg Ala Leu Ala
1265 1270 1275 1280
Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Ala Glu Glu Asn Leu Ala Arg Gly Leu
1285 1290 1295
Leu Asp Leu Gly His Ala Gly Arg Leu Gly Ile Ser Cys Thr Arg Leu
1300 1305 1310
Arg Arg Leu Arg Asn Lys Thr Ala His Gln Met Lys Val Gln His Phe
1315 1320 1325
Tyr Gln Gln Leu Leu Ser Asp Val Ala Trp Ala Ser Leu Asp Leu Pro

1330	1335	1340	
Ser Leu Val Ala Glu His Leu Pro Gly Arg Gln Glu His Val Phe Trp			
1345	1350	1355	1360
Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp Val Glu Glu Gln Ser Pro Glu Ser			
1365	1370	1375	
Cys Gly Arg Ile Leu Ala Asn Trp Leu Lys Val Lys Phe Met Gly Asp			
1380	1385	1390	
Glu Gly Ser Val Asp Asp Thr Ser Ser Asp Ala Gly Gly Ile Gln Thr			
1395	1400	1405	
Leu Ser Leu Phe Asn Ser Leu Ser Ser Lys Gly Asp Gln Met Ile Ser			
1410	1415	1420	
Val Asn Val Cys Ile Lys Val Ala His Gly Ala Leu Ser Asp Gly Ala			
1425	1430	1435	1440
Ile Asp Ala Val Glu Thr Gln Lys Asp Leu Leu Gly Ala Ser Gly Leu			
1445	1450	1455	
Met Leu Leu Leu Pro Pro Lys Met Lys Ser Glu Asp Met Ala Glu Glu			
1460	1465	1470	
Asp Val Tyr Trp Leu Ser Ala Leu Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln			
1475	1480	1485	
Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser			
1490	1495	1500	
Pro Gly Gly Asp Ala Val Glu Lys Glu Val Glu Asp Gly Leu Met Leu			
1505	1510	1515	1520
Gln Asp Leu Val Ser Ala Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Thr Val Thr Glu			
1525	1530	1535	
Ile Pro Asp Thr Ile Asn Asp Leu Gln Gly Ser Thr Lys Val Leu Gln			
1540	1545	1550	

Ala Val Gln Trp Leu Val Ser His Cys Pro His Ser Leu Asp Leu Cys
 1555 1560 1565
 Cys Gln Thr Leu Ile Gln Tyr Val Glu Asp Gly Ile Gly His Glu Phe
 1570 1575 1580
 Ser Gly Arg Phe Phe His Asp Arg Arg Glu Arg Arg Leu Gly Gly Leu
 1585 1590 1595 1600
 Ala Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ile Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu
 1605 1610 1615
 Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser Ser Glu Gln Leu Cys Asp Leu Ser
 1620 1625 1630
 Trp Pro Val Thr Glu Phe Ala Glu Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Pro
 1635 1640 1645
 His Leu His Trp Asn Ala Pro Glu His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala
 1650 1655 1660
 Val Leu Gly Phe Gln Leu Pro Gln Met Asp Leu Pro Pro Leu Gly Ala
 1665 1670 1675 1680
 Pro Trp Leu Pro Val Cys Ser Met Val Val Gln Tyr Ala Ser Gln Ile
 1685 1690 1695
 Pro Ser Ser Arg Gln Thr Gln Pro Val Leu Gln Ser Gln Val Glu Asn
 1700 1705 1710
 Leu Leu His Arg Thr Tyr Cys Arg Trp Lys Ser Lys Ser Pro Ser Pro
 1715 1720 1725
 Val His Gly Ala Gly Pro Ser Val Met Glu Ile Pro Trp Asp Asp Leu
 1730 1735 1740
 Ile Ala Leu Cys Ile Asn His Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg
 1745 1750 1755 1760
 Leu Pro Val Thr Ser Glu Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys Val

1765	1770	1775	
Tyr Phe Phe Lys Asn Asp Leu Lys Lys Tyr Asp Val Pro Leu Ser Trp			
1780	1785	1790	
Glu Gln Ala Arg Leu Gln Thr Gln Lys Glu Leu Gln Leu Arg Glu Gly			
1795	1800	1805	
Arg Leu Ala Ile Lys Pro Phe His Pro Ser Ala Asn Asn Phe Pro Ile			
1810	1815	1820	
Pro Leu Leu His Met His Arg Asn Trp Lys Arg Ser Thr Glu Cys Ala			
1825	1830	1835	1840
Gln Glu Gly Arg Ile Pro Ser Thr Glu Asp Leu Met Arg Gly Ala Ser			
1845	1850	1855	
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gln Cys Leu Ser Ser Ser Leu Leu Leu Glu			
1860	1865	1870	
Lys Glu Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser			
1875	1880	1885	
Glu Asp Ser Gly Ala Phe Thr Asp Leu Thr Ser Leu Pro Leu Tyr Leu			
1890	1895	1900	
Pro Gln Thr Leu Val Ser Leu Ser His Thr Ile Glu Pro Val Met Lys			
1905	1910	1915	1920
Thr Ser Val Thr Thr Ser Pro Gln Ser Asp Met Met Arg Glu Gln Leu			
1925	1930	1935	
Gln Leu Ser Glu Ala Thr Gly Thr Cys Leu Gly Glu Arg Leu Lys His			
1940	1945	1950	
Leu Glu Arg Leu Ile Arg Ser Ser Arg Glu Glu Glu Val Ala Ser Glu			
1955	1960	1965	
Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Asp Met Val Asp Ile			
1970	1975	1980	

<210> 4

<211> 6114

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

gtaataactta attaccttct aataattgga gcagaag atg aac cca act aat	52
cct ttc agt ggg cag cag cct agt gct ttt tcg gcg tct tct agt aat	100
gta gga aca ctt cca tct aag cgg cca ttt cga ttt ggt caa cct tct	148
ctt ttt gga caa aac agt acc tta tct ggg aag agc tcg gga ttt tca	196
cag gta tcc agc ttt cca gcg tct tct gga gta agt cat tcc tct tca	244
gtg caa aca tta ggg ttc acc caa acc tca agt gtt gga ccc ttt tct	292
gga ctt gag cac act tcc acc ttt gtg gct acc tct ggg cct tca agt	340
tca tct gtg ctg gga aac aca gga ttt agt ttt aaa tca ccc acc agt	388
gtt ggg gct ttc cca agc act tct gct ttt gga caa gaa gct gga gaa	436
ata gtg aac tct ggt ttt ggg aaa aca gaa ttc agc ttt aaa cct ctg	484
gaa aat gca gtg ttc aaa cca ata ctg ggg gct gaa tct gag cca gag	532
aaa acc cag agc caa att gct tct ggg ttt ttt aca ttt tcc cac cca	580
att agt agt gca cct gga ggc ctg gcc cct ttc tct ttt cct caa gta	628
aca agt agt tca gct acc act tca aat ttt acc ttt tca aaa cct gtt	676
agt agt aat aat tca tta tct gcc ttt acc cct gct ttg tca aac caa	724
aat gta gag gaa gag aag aga gga cct aag tca ata ttt gga agt tct	772
aat aat agc ttc agt agc ttc cct gta tca tct gcg gtt ttg ggc gaa	820
cct ttc cag gct agc aaa gca ggt gtc agg cag ggg tgt gaa gaa gct	868
gtt tcc cag gtg gaa cca ctt ccc agc cta atg aaa gga ctg aaa agg	916
aag gag gac cag gat cgc tcc cca agg aga cat ggc cac gag cca gca	964
gaa gat tcg gat cct ctg tcc cgg ggc gat cat cct cca gac aaa cga	1012
cct gtc cgc ctg aat cga ccc cgg gga ggt act tta ttt ggt cgg acg	1060

ata cag gat gtt ttc aaa agc aat aag gaa gta ggt cgt ctg ggc aac	1108
aag gag gcc aaa aag gaa act ggc ttt gtt gag tct gca gaa agt gac	1156
cac atg gct atc cca gga ggg aat cag tct gtc ctg gca cct tcc cgg	1204
att cca ggt gtg aat aaa gag gaa gaa act gaa agt aga gag aag aaa	1252
gaa gat tct cta aga gga act ccg gcg cgt cag agt aac aga agc gag	1300
agc aca gac agt ctt ggg ggc ttg tct ccc tct gaa gtc aca gcc atc	1348
cag tgc aag aac atc cct gac tac ctc aac gac agg acc att ctg gag	1396
aac cat ttt ggc aaa att gct aaa gtg cag cgc atc ttt acc agg cgc	1444
agc aaa aag ctt gca gtg gta cat ttc ttt gat cat gca tct gca gcc	1492
ctg gct aga aag aag ggg aaa agt ttg cat aaa gac atg gct atc ttt	1540
tgg cac agg aag aaa ata agc ccc aat aag aaa ccc ttt tcc ctg aag	1588
gag aag aaa cca ggt gac ggt gaa gtc agc ccg agc aca gag gat gca	1636
ccc ttt cag cac tct cct ctt ggc aag gcc gca ggg agg act ggt gct	1684
agc agc ctc ctg aat aaa agc tct cca gtg aag aag cca agt ctt cta	1732
aag gcc cac caa ttc gag gga gac tct ttt gac tca gcc tcc gag ggc	1780
tcc gag ggc ctc ggg cca tgt gtg ctc tcc ctc agt acc ctg ata ggc	1828
act gtg gct gag aca tcc aag gag aag tac cgc ctg ctt gac cag aga	1876
gac agg atc atg cgg caa gct cgg gtg aag aga acc gat ctg gac aaa	1924
gcg agg act ttt gtt ggc acc tgc ctg gat atg tgt cct gag aag gag	1972
agg tac atg cgg gag acc cgt agc cag ctg agc gtg ttc gaa gtg gtc	2020
cca ggg act gac cag gtg gac cac gca gca gct gtg aaa gag tac agt	2068
cgg tcc tcg gcg gat cag gag gag ccc ctg ccc cac gag ctg cgg ccc	2116
ttg cca gtg ctc agc agg acc atg gac tac ctg gtg acc cag atc atg	2164
gac cag aag gag ggc agc ctg cgg gat tgg tat gac ttc gtg tgg aac	2212
cgc acg cgt ggc ata cgg aag gat atc acg cag cag cac ctc tgt gac	2260
ccc ctg acg gtg tcc ctg att gag aag tgc acc cgg ttt cac atc cac	2308
tgt gcc cac ttc atg tgt gag gag ccc atg tcc tcc ttt gat gcc aag	2356

atc aat aat gag aac atg acc aag tgc ctg cag agc ctg aag gag atg	2404
tac cag gac ctg aga aac aag ggt gtc ttc tgt gcc agc gaa gcg gag	2452
ttc cag ggc tac aat gtt ctg ctc agt ctc aac aag gga gac atc cta	2500
aga gaa gta caa cag ttc cat cct gct gtt aga aac tca tct gag gtg	2548
aaa ttt gct gtt cag gct ttt gct gca ttg aac agt aat aat ttt gtg	2596
aga ttt ttc aaa ctg gtc cag tca gct tct tac ctg aac gct tgt ctt	2644
tta cac tgt tac ttc agt cag atc cgc aag gat gct ctc cgg gcg ctc	2692
aac ttt gcg tac acg gtg agc aca cag cga tct acc atc ttt ccc ctg	2740
gat ggt gtg gtg cgc atg ctg ctg ttc aga gac tgt gaa gag gcc acc	2788
gac ttc ctc acc tgc cac ggc ctc acc gtt tcc gac ggc tgt gtg gag	2836
ctg aac cgg tct gca ttc ctg gaa cca gag gga tta tcc aag acc agg	2884
aag tgc gtg ttt att act agg aag ctg acg gtg tca gtc ggg gaa att	2932
gtg aac gga ggg cca ttg ccc ccc gtc cct cgt cac acc cct gtg tgc	2980
agc ttc aac tcc cag aac aag tac atc ggg gag agc ctg gcc gcg gag	3028
ctg ccc gtc agc acc cag aga ccc ggc tcc gac aca gtg ggc gga ggg	3076
aga gga gag gag tgt ggt gta gag ccg gat gca ccc ctg tcc agt ctc	3124
cca cag tct cta cca gcc cct gcg ccc tca cca gtg cct ctg cct cct	3172
gtc ctg gca ctg acc ccg tct gtg gcg ccc agc ctc ttc cag ctg tct	3220
gtg cag cct gaa cca ccg cct cca gag ccc gtg ccc atg tac tct gac	3268
gag gac ctg gcg cag gtg gtg gac gag ctc atc cag gag gcc ctg cag	3316
agg gac tgt gag gaa gtt ggc tct gcg ggt gct gcc tac gca gct gcc	3364
gcc ctg ggt gtt tct aat gct gct atg gag gat ttg tta aca gct gca	3412
acc acg ggc att ttg agg cac att gca gct gaa gaa gtg tct aag gaa	3460
aga gag cga agg gag cag gag agg cag cgg gct gaa gag gaa agg ttg	3508
aaa caa gag aga gag ctg gtg tta agt gag ctg agc cag ggc ctg gcc	3556
gtg gag ctg atg gaa cgc gtg atg atg gag ttt gtg agg gaa acc tgc	3604
tcc cag gag ttg aag aat gca gta gag aca gac cag agg gtc cgt gtg	3652

gcc cgt tgc tgt gag gat gtc tgt gcc cac tta gtg gac ttg ttt ctc 3700
gtg gag gaa atc ttc cag act gca aag gag acc ctc cag gag ctt cag 3748
tgc ttc tgc aag tat cta cag cgg tgg agg gaa gct gtc aca gcc cgc 3796
aag aaa ctg agg cgc caa atg cgg gct ttc cct gct gcg ccc tgc tgc 3844
gtg gac gtg agc gac cgg ctg agg gcg ctg gcg ccc agc gca gag tgc 3892
ccc att gct gaa gag aac ctg gcc agg ggc ctc ctg gac ctg ggc cat 3940
gca ggg aga ttg ggc atc tct tgc acc agg tta agg cgg ctc aga aac 3988
aag aca gct cac cag atg aag gtt cag cac ttc tac cag cag ctg ctg 4036
agt gat gtg gca tgg gcg tct ctg gac ctg cca tcc ctc gtg gct gag 4084
cac ctc cct ggg agg cag gag cat gtg ttt tgg aag ctg gtg ctg gtg 4132
ttg ccg gat gta gag gag cag tcc cca gag agt tgt ggc aga att cta 4180
gca aat tgg tta aaa gtc aag ttc atg gga gat gaa ggc tca gtg gat 4228
gac aca tcc agc gat gct ggt ggg att cag acg ctt tcg ctt ttc aac 4276
tca ctt agc agc aaa ggg gat cag atg att tct gtt aac gtg tgt ata 4324
aag gtg gcc cat ggc gcc ctc agt gat ggt gcc att gat gct gtg gag 4372
aca cag aag gac ctc ctg gga gcc agt ggg ctc atg ctg ctg ctt ccc 4420
ccc aaa atg aag agt gag gac atg gca gag gag gac gtg tac tgg ctg 4468
tcg gcc ttg ctg cag ctc aag cag ctc ctg cag gct aag ccc ttc cag 4516
cct gcg ctt cct ctg gtg gtt ctt gtg cct agc cca gga ggg gac gcc 4564
gtt gag aag gaa gta gaa gat ggt ctg atg cta cag gac ttg gtt tca 4612
gct aag ctg att tca gat tac act gtt acc gag atc cct gat acc att 4660
aat gat cta caa ggt tca act aag gtt ttg caa gca gtg cag tgg ctg 4708
gtt tcc cac tgc ccc cat tcc ctt gac ctc tgc tgc cag act ctc att 4756
cag tac gtc gaa gac ggg att ggc cat gag ttt agt ggc cgc ttt ttc 4804
cat gac aga aga gag agg cgt ctg ggc ggt ctt gct tct cag gag cct 4852
ggc gcc atc att gag ctg ttt aac agt gtg ctg cag ttc ctg gct tct 4900
gtg gtg tcc tct gaa cag ctg tgt gac ctg tcc tgg cct gtc act gag 4948

ttt gct gag gca ggg ggc agc cgg ctg ctt cct cac ctg cac tgg aat 4996
gcc cca gag cac ctg gcc tgg ctg aag cag gct gtg ctc ggg ttc cag 5044
ctt ccg cag atg gac ctt cca ccc ctg ggg gcc ccc tgg ctc ccc gtg 5092
tgc tcc atg gtt gtc cag tac gcc tcc cag atc ccc agc tca cgc cag 5140
aca cag cct gtc ctc cag tcc cag gtg gag aac ctg ctc cac aga acc 5188
tac tgt agg tgg aag agc aag agt ccc tcc cca gtc cat ggg gca ggc 5236
ccc tcg gtc atg gag atc cca tgg gat gat ctt atc gcc ttg tgt atc 5284
aac cac aag ctg aga gac tgg acg ccc ccc cgg ctt cct gtt aca tca 5332
gag gcg ctg agt gaa gat ggt cag ata tgt gtg tat ttt ttt aaa aac 5380
gat ttg aaa aaa tat gat gtt cct ttg tcg tgg gaa caa gcc agg ttg 5428
cag acg cag aag gag cta cag ctg aga gag gga cgt ttg gca ata aag 5476
cct ttt cat cct tct gca aac aat ttt ccc ata cca ttg ctt cac atg 5524
cac cgt aac tgg aag agg agc aca gag tgt gct caa gag ggg agg att 5572
ccc agc aca gag gat ctg atg cga gga gct tct gct gag gag ctc ttg 5620
gcg cag tgt ttg tcg agc agt ctg ctg ctg gag aaa gaa gag aac aag 5668
agg ttt gaa gat cag ctt cag caa tgg ttg tct gaa gac tca gga gca 5716
ttt acg gat tta act tcc ctt ccc ctc tat ctt cct cag act cta gtg 5764
tct ctt tct cac act att gaa cct gtg atg aaa aca tct gta act act 5812
agc cca cag agt gac atg atg agg gag caa ctg cag ctg tca gag gcg 5860
aca gga acg tgt cta ggc gaa cga cta aag cac ctg gaa agg ctg atc 5908
cgg agt tca agg gaa gag gaa gtt gcc tct gag ctc cat ctc tct gcg 5956
ctg cta gac atg gtg gac att tga gcagcctgac ctgtggggag ggggtctctc 6010
ccgaagagtt tctgttttta ctcaaaataa tgttattctc agatgcttga tgcactgttg 6070
gaaatgtgat taatttaate atgcagataa accatttaaa tgtc 6114

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Synthetic DNA
<400> 5
ccgtgggatg acatcatcac 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Synthetic DNA
<400> 6
catgtccacc atctccagca 20
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Synthetic DNA
<400> 7
tttgtctgga ggatgatcgc 20
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Synthetic DNA
<400> 8
aaagagaaag gggccaggcc 20
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Synthetic DNA
<400> 9
ccagcttctt gtccaaaagc 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁶ C12N15/57, C12N9/64, C12P21/08, C07K16/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁶ C12N15/57, C12N9/64, C12P21/08, C07K16/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Thomas C., et al., "M17: a novel gene expressed in germinal centers", International Immunology (1994), Vol. 6, No. 8, p.1203-1211	1-9
A	Ming-Jie Li, et al., "Rad51 expressio and localization in B cells carrying out class switch recombination", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996), Vol. 93, No. 19, p.10222-10227	1-9
A	Frank C., et al., "Augmented expression of a human gene for 8-oxoguanine DNA glycosylase in B lymphocytes of the dark zone in lymph node germinal centers", J. Exp. Med. (1997), Vol. 186, No. 9, p.1547-1556	1-9
A	Masaki Hikida, et al., "Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells", Science (1996), Vol. 274, No. 5295, p.2092-2094	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
27 October, 1999 (27. 10. 99)

Date of mailing of the international search report
9 November, 1999 (09. 11. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04634

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shuhua H., et al., "Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells", Science (1996), Vol. 274, No. 5295, p.2094-2097	1-9
A	Kazuhiko Kuwahara, et al., "Identification of a 52-kDa molecule coprecipitated with the Ig receptor-related MB-1 protein that is inducibly phosphorylated by the stimulation with phorbol myristate acetate", J. Immunol. (1994), Vol. 152, p.2742-2752	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04634

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/57, C12N 9/64, C12P 21/08, C07K 16/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/57, C12N 9/64, C12P 21/08, C07K 16/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Thomas C., et al. "M17: a novel gene expressed in germinal centers", International Immunology(1994), Vol.6, No.8, p.1203-1211	1-9
A	Ming-Jie Li, et al. "Rad51 expression and localization in B cells carrying out class switch recombination", Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1996), Vol.93, No.19, p.10222-10227	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 10. 99

国際調査報告の発送日

09.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Frank C., et al. "Augmented expression of a human gene for 8-oxoguanine DNA glycosylase in B lymphocytes of the dark zone in lymph node germinal centers", J. Exp. Med. (1997), Vol. 186, No. 9, p. 1547-1556	1-9
A	Masaki Hikida, et al. "Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells", Science (1996), Vol. 274, No. 5295, p. 2092-2094	1-9
A	Shuhua H., et al. "Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells", Science (1996), Vol. 274, No. 5295, p. 2094-2097	1-9
A	Kazuhiko Kuwahara, et al. "Identification of a 52-kDa molecule coprecipitated with the Ig receptor-related MB-1 protein that is inducibly phosphorylated by the stimulation with phorbol myristate acetate", J. Immunol. (1994), Vol. 152, p. 2742-2752	1-9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.